

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal I



**DESARROLLO DE TÉCNICAS DE ADN PARA EL DIAGNÓSTICO
Y CARACTERIZACIÓN DE “TOXOPLASMA GONDII”:
APLICACIÓN A ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel de Fuentes Corripio

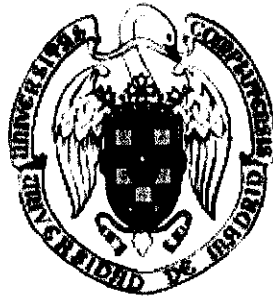
Bajo la dirección del doctor

Jorge Alvar Ezquerro

Madrid, 1999

ISBN: 84-669-2430-2

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL I
CÁTEDRA DE PARASITOLOGÍA



**DESARROLLO DE TÉCNICAS DE ADN PARA EL DIAGNÓSTICO Y
CARACTERIZACIÓN DE *Toxoplasma gondii*. APLICACIÓN A
ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.**

ISABEL DE FUENTES CORRIPIO
Madrid, 1999

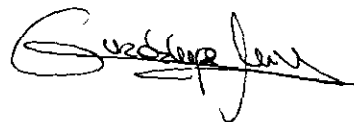
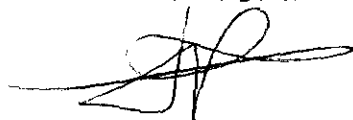
ACTA DEL COMITÉ DIRECTOR

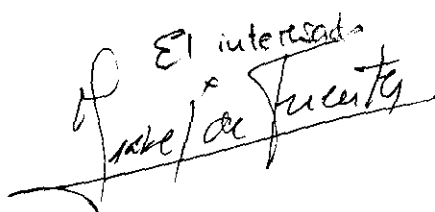
Leído por el liberal examinador,
constando en los autos que suscri-
ben la presente Acta, el aspirante defen-
dió su tesis sobre el tema escrito
libremente sobre el siguiente tema:
DESARROLLO DE TÉCNICAS DE ADN
PARA EL DIAGNÓSTICO Y CARACTERI-
ZACIÓN DE TOXOPLASMA GONDII.
APLICACIÓN A ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS.

He sido dictada por:

Terminada la lectura y contestadas
por el tesista las objeciones formula-
das por el Comité Directivo del Tribunal,
éste calificó dicho trabajo con la nota de:

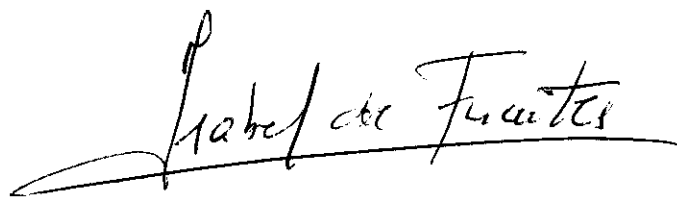
.....
Mes de 13 de Julio de 1999
EL PRESIDENTE VOCALES SECRETARIO



El interesado


Por el CULP


Memoria presentada por la licenciada
Dña. Isabel de Fuentes Corripio
para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

A handwritten signature in black ink, reading "Isabel de Fuentes". The signature is written in a cursive style with a long horizontal flourish at the end.

Fdo: Isabel de Fuentes Corripio.

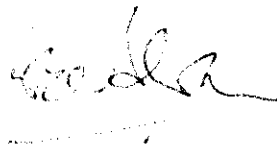
Madrid, Abril 1999.

D. JORGE ALVAR EZQUERRA, JEFE DEL SERVICIO DE PARASITOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.

CERTIFICA:

Que el trabajo experimental correspondiente a la Memoria titulada "**Desarrollo de técnicas de ADN para el diagnóstico y caracterización de *Toxoplasma gondii*. Aplicación a estudios epidemiológicos**" ha sido realizado por Dña. Isabel de Fuentes Corripio bajo mi dirección en los laboratorios del Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología. El trabajo reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal que proceda.

Y para que conste donde proceda, se firma la presente en Majadahonda a 5 de abril de 1999.



Fdo: Dr. Jorge Alvar Ezquerro

D. LUCAS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE
PATOLOGÍA ANIMAL I DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que la licenciada Dña. Isabel de Fuentes Corripio ha realizado bajo la dirección del Dr. Jorge Alvar Ezquerro la memoria titulada "**Desarrollo de técnicas de ADN para el diagnóstico y caracterización de *Toxoplasma gondii*. Aplicación a estudios epidemiológicos**" para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid.

Fdo: Lucas Domínguez Rodríguez

La presente memoria ha sido financiada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, del Ministerio de Sanidad y Consumo, a través del proyecto FIS 96/0052-01

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y colaboración de muchas personas. A todas ellas quiero expresar mi reconocimiento y, ya que no es posible nombrar a todos los que de algún modo han participado, quiero agradecer muy especialmente:

A Jorge Alvar por la dirección de este trabajo, por su apoyo y confianza. Su tesón, energía y profesionalidad han supuesto un ejemplo a seguir en todo momento.

A José Miguel Rubio por la ayuda desinteresada, tanto científica como personal, en los buenos y malos momentos. Sin su apoyo incondicional esta tesis no se habría realizado.

A Mercedes Gómez Bautista por su consejo y estímulo en los momentos difíciles

A Gustavo del Real, que me introdujo en el terreno de las zoonosis, abriendo mi mente hacia la Salud Pública y la colaboración interdisciplinar. Su entusiasmo, juventud de espíritu y sabiduría han sido siempre un modelo.

A Mercedes Rodríguez, por su colaboración y la realización de las determinaciones serológicas que han permitido completar este estudio.

A todos mis compañeros colaboradores del Proyecto de Investigación FIS 96/0052, muy especialmente a Carlos Domingo, del C.N.M.; a Fernando del Castillo, Concha Ladrón de Guevara y Ana Guerra, del hospital "La Paz" y a Concha Pérez del Centro de Especialidades de Carabanchel, ya que gracias a su trabajo y colaboración ha sido posible desarrollar el estudio de la toxoplasmosis en gestantes y congénitos.

A los profesores Antonio Martínez, Begoña Díez y Juan Antonio Castillo por la cesión de las cepas estudiadas en este trabajo.

A Javier Nieto, Emi, M^a Carmen, Esperanza, Almudena y Charo, amigos y compañeros a lo largo del tiempo, por su ánimo y apoyo.

A todos y cada uno de mis compañeros del Servicio de Parasitología del C.N.M., por su interés y ayuda, especialmente:

A M^a Carmen e Israel, que en muchas ocasiones actuaron como mis manos y siempre me infundieron ánimo. Su alegría es un lujo en el trabajo.

A Marga y Rosa, por su ayuda y buen hacer en todo momento.

A Agustín por todo el apoyo y pronta colaboración, siempre de buen grado.

A Jesús Roche, por sus consejos en el estudio epidemiológico. A Ricardo, Teresa y Javier Moreno por su apoyo.

A Beatriz Gutierrez del Solar, que me inició en el mundo de la biología molecular y cuyos consejos han sido de gran ayuda.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias por la financiación económica a través del Proyecto de Investigación FIS 96/0052.

A mi familia. Quiero agradecer muy especialmente el cariño, ánimo y ayuda desinteresada derrochada en todo momento para que una “hija-esposa-madre-trabajadora-doctoranda” sea capaz de terminar la tesis.

A mis padres por el ejemplo, estímulo y coraje.

A Josep María por el gran apoyo, ayuda, confianza, paciencia, ánimo y empuje recibidos en todo momento, sin los que esta tesis no habría podido ser realizada.

A Nuria e Isabel por la comprensión y el tiempo cedido, que debemos recuperar.

A Josep Maria
A Nuria e Isabel
A mis padres

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
ATP:	Adenosin trifosfato
cpm:	Cuentas por minuto
dNTP:	Desoxinucleótidos trifosfato
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Ácido tetracético diamino etileno
ELISA:	Enzimoimmuno análisis
EtBr:	Bromuro de etidio
GTP:	Guanosin trifosfato
IC:	Intervalo de confianza
IFI:	Inmunofluorescencia indirecta
Kb:	Kilobase
Kda:	Kilodalton
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
Ma:	Miliamperio
min:	Minuto
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción encadena de la polimerasa
PBS:	Tampón fosfato salino
p/v:	Peso/volumen
rpm:	Revoluciones por minuto
s:	Segundos
SSC:	Tampón citrato salino
SDS:	Dodecilsulfato sódico
TE:	Toxoplasmosis encefálica
UV:	Ultravioleta

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. <i>Toxoplasma gondii</i>	1
2. CICLO BIOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURA	2
2.1. Trofozoítos.....	2
2.1.1. Mecanismos de invasión y desarrollo intracelular.....	6
2.2. Bradizoítos.....	7
2.3. Esporozoítos.....	10
2.4. Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	10
3. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR.....	14
4. TOXOPLASMOSIS ANIMAL.....	15
5. TOXOPLASMOSIS HUMANA	19
5.1. Toxoplasmosis en pacientes inmunocompetentes	19
5.2. Toxoplasmosis en pacientes inmunocomprometidos	20
5.3. Toxoplasmosis en mujeres embarazadas.....	23
5.3. Toxoplasmosis congénita	24
6. DIAGNÓSTICO.....	26
6.1. Diagnóstico inmunológico	26
6.1.1. Detección de anticuerpos IgG	27
6.1.2. Detección de anticuerpos IgM	29
6.1.3. Detección de anticuerpos IgA.....	30
6.1.4. Detección de anticuerpos IgE.....	31
6.1.5. Diagnóstico por técnicas de inmunoblot.....	31
6.2. Diagnóstico radiológico	32
6.3. Diagnóstico parasitológico directo	32
6.3.1. Diagnóstico histólogo.....	33
6.3.2. Diagnóstico por aislamiento de <i>Toxoplasma gondii</i>	34
6.3.3. Diagnóstico por detección de antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i>	34
6.3.4. Detección del ADN de <i>T.gondii</i> por métodos moleculares	35
7. EPIDEMIOLOGÍA.....	40
8. CARACTERIZACIÓN DE <i>Toxoplasma gondii</i>	43

OBJETIVOS..... 51

2.2.3.1.2.2. Aislamiento y extracción del ADN de la muestra	65
2.2.3.2. Amplificación de ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> mediante la técnica de PCR	66
2.2.3.2.1. PCR simple	67
2.2.3.2.2. PCR secuencial interna	68
2.2.3.3. Detección de ADN de <i>T.gondii</i> con sonda	70
2.2.3.3.1. Transferencia de ADN	70
2.2.3.3.2. Hibridación con oligosonda	70
2.3. Caracterización de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	72
2.3.1. Caracterización genómica de las cepas de <i>T.gondii</i>	72
2.3.1.1. Aislamiento de ADN	72
2.3.1.2. Amplificación del extremo 5' del gen SAG2	72
2.3.1.3. Amplificación del extremo 3' del gen SAG2	73
2.3.1.4. Análisis del patrón obtenido con enzimas de restricción	74
2.3.1.4.1. Purificación de los productos de amplificación	74
2.3.1.4.2. Digestión con enzimas de restricción	75
2.4. Estudio epidemiológico	75
2.4.1. Ámbito de estudio	76
2.4.2. Sujetos de estudio	76
2.4.3. Diseño	76
2.4.4. Instrumentalización	76
2.4.4.1. Estudio serológico	76
2.4.4.2. Estudio de aislamiento	77
2.4.4.3. Estudio de detección de ADN de <i>T.gondii</i>	77
2.4.4.4. Estudio de variables epidemiológicas implicadas en la toxoplasmosis	77
2.4.4.5. Análisis de los datos	78

RESULTADOS

1. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE <i>Toxoplasma gondii</i>	79
1.1. Estandarización de las técnicas de amplificación <i>in vitro</i> del ADN de <i>T.gondii</i>	79
1.1.1. Optimización de la reacción de amplificación del ADN por la técnica PCR simple	79

1.1.1.1. Sensibilidad de la PCR simple	81
1.1.1.2. Especificidad de la PCR simple	83
1.1.2. Hibridación con oligosond específica de <i>T.gondii</i>	83
1.1.2.1. Sensibilidad de la hibridación	83
1.1.2.2. Especificidad de la hibridación	87
1.1.3. Optimización de la técnica de PCR secuencial interna.....	87
1.1.3.1. Sensibilidad de la PCR secuencial interna	88
1.1.3.2. Especificidad de la PCR secuencial interna.....	88
1.2. Aplicación de la PCR en la detección del ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras clínicas	91
1.2.1. Determinación de los métodos de procesamiento y extracción de ADN de los diversos tipos de muestras biológicas	91
1.2.2. Estudio de detección de ADN de diversas cepas de <i>T.gondii</i> por PCR en diferentes tipos de muestras de ratones parasitados	92
1.2.3. Detección de ADN de <i>T.gondii</i> por PCR en muestras clínicas para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana.....	93
1.2.3.1. Pacientes inmunodeprimidos VIH positivos	96
1.2.3.2. Pacientes inmunodeprimidos VIH negativos	99
1.2.3.3. Pacientes inmunocompetentes	101
1.2.3.4. Mujeres embarazadas	101
1.2.3.5. Recién nacidos	102
2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN MUJERES GESTANTES EN MADRID. VALORACIÓN DE LAS ACTUALES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	105
2.1. Seroprevalencia e incidencia de la toxoplasmosis en mujeres gestantes en Madrid.....	105
2.1.1. Seroprevalencia	105
2.1.2. Incidencia.....	109
2.2. Diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres embarazadas y recién nacidos	113
2.2.1. Estudio de diagnóstico serológico	113
2.2.2. Estudio de detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	120
2.2.2.1. Detección del ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR.....	122
2.2.2.2. Aislamiento por inoculación a ratón	125
2.3. Análisis de variables epidemiológicas implicadas en la toxoplasmosis	125
3. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>T.gondii</i> CON TÉCNICAS MOLECULARES.....	131
3.1. Caracterización genómica de las cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	131

3.2. Caracterización genómica de las cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> circulantes en España.....	134
3.2.1. Caracterización de cepas autóctonas procedentes de animales	134
3.2.2. Caracterización de cepas procedentes de muestras clínicas humanas	136

DISCUSIÓN

1. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE <i>Toxoplasma gondii</i>	142
1.1. Amplificación <i>in vitro</i> del ADN de <i>T.gondii</i>	142
1.2. Aplicación de la PCR en la detección del ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> en muestras clínicas.....	144
1.2.1. Pacientes inmunodeprimidos VIH +	148
1.2.2. Pacientes inmunodeprimidos VIH-	152
1.2.3. Pacientes inmunocompetentes	154
1.2.4. Mujeres embarazadas	154
1.2.5. Recién nacidos	156
2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN MUJERES GESTANTES EN MADRID. VALORACIÓN DE LAS ACTUALES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.....	158
2.1. Seroprevalencia e incidencia de la toxoplasmosis en mujeres gestantes en Madrid.....	158
2.2. Diagnóstico de toxoplasmosis en mujeres embarazadas y recién nacidos.....	160
2.2.1. Diagnóstico serológico.....	160
2.2.2. Detección de <i>Toxoplasma gondii</i>	164
2.3. Variables epidemiológicas implicadas en la toxoplasmosis.....	167
3. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>T.gondii</i> CON TÉCNICAS MOLECULARES.....	169
3.1. Caracterización genómica	169
3.2. Caracterización genómica de las cepas de <i>T.gondii</i> circulantes en España.....	172
CONCLUSIONES.....	178

RESUMEN.....	180
---------------------	------------

BIBLIOGRAFIA.....	181
--------------------------	------------

ANEXOS

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial, ocasionada por *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Marceaux, 1909), un protozoo intracelular potencialmente capaz de invadir y multiplicarse en cualquier célula nucleada de todos los animales homeotermos (Frenkel, 1988).

Los primeros trabajos en los que se menciona la presencia de un protozoo de características similares al hoy conocido como *Toxoplasma*, fueron los realizados por Charles L. Laveran en 1900 describiendo un nuevo parásito en aves infectadas con *Haemamoeba danilewskyi*. Sin embargo, nuestro coccidio fue aislado y descrito por primera vez en 1908 por Charles Nicolle y Louis Manceaux a partir de células mononucleares de hígado y bazo de un roedor norteafricano denominado "gondi" (*Ctenodactylus gondii*), utilizado como modelo experimental en las investigaciones sobre leishmaniasis. El parásito recibió el nombre de *Toxoplasma* debido a su forma arqueada (del griego *toxon* = arco y *plasma* = forma) y *gondii* por el animal en que se aisló.

La posición sistemática de éste parásito ha sido modificada en numerosas ocasiones, prevaleciendo en la actualidad el criterio seguido por Levine en 1973 y aceptado por Frenkel en 1977, según el cual se le incluye en:

Reino *Protozoa*.

Phylum *Apicomplexa* Levine, 1970.

Clase *Sporozoea* Leuckart, 1879.

Subclase *Coccidia* Leuckart, 1879.

Orden *Eucoccidiida* Léger y Dubosq, 1910.

Suborden *Eimeriina* Léger, 1911.

Familia *Sarcocystidae* Poche, 1913.

Subfamilia *Toxoplasmatinae* Biocca, 1956.

Género *Toxoplasma* Nicolle y Manceaux, 1909.

Especie *Toxoplasma gondii* Nicolle y Manceaux, 1909.

2.- CICLO BIOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURA.

Toxoplasma gondii tiene un ciclo biológico muy complejo con diferentes formas invasivas, tanto en el hospedador definitivo como en el intermediario. Los diferentes zoítos (esporozoítos, taquizoítos, bradizoítos y merozoítos), fruto de las distintas modalidades de reproducción, tienen forma constante y están capacitados para penetrar en una nueva célula del hospedador y proseguir el ciclo biológico (Martínez-Fernández y col, 1998).

Se destacan tres estadios infectantes del parásito:

2.1. TROFOZOÍTO

El trofozoíto o forma proliferativa también denominado taquizoíto (del griego *tachos* = rápido). Presenta forma de semiluna y mide 2-4 μm de ancho y 4-7 μm de largo. Es el estadio de multiplicación rápida y la principal forma patógena del parásito ya que es el responsable de las manifestaciones clínicas presentes durante la fase aguda de la enfermedad. Es una forma intracelular obligada que requiere una célula huesped para desarrollarse, no pudiendo sobrevivir ni multiplicarse extracelularmente.

En la observación al microscopio electrónico se aprecia que el parásito está delimitado por una película trilaminar consistente en el plasmalema, que está en contacto con el medio externo, y el complejo membranoso interno, formado por dos citomembranas localizadas debajo. Esta estructura presenta un papel importante en los procesos de ataque e invasión de las células hospedadoras y en la comunicación, permeabilidad y motilidad del parásito (Rabjeau y col., 1997). En su composición se ha encontrado una alta proporción de lípidos/proteínas (Foussard y col., 1990), detectándose las principales proteínas de superficie, como la SAG1 (P30) de 30 kDa, que es el principal componente del plasmalema (Rabjeau y col., 1997) y otras proteínas de superficie como SAG2, SAG3, SAG4 y SAG5. Esta pared está interrumpida por el microporo que atraviesa el complejo membranoso interno.

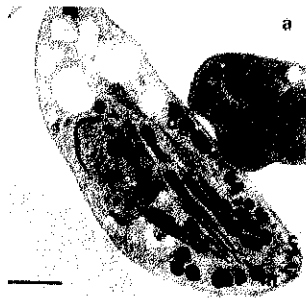
Toxoplasma gondii, como otros miembros del phylum Apicomplexa, posee una estructura polar determinada por la conformación de un complejo apical o citoesqueleto. El citoesqueleto comprende un conoide, de estructura filamentosa que contiene un

espiral de filamentos de 26 a 30 nm, y el anillo polar que se encuentra en su base y sirve de inserción a 20-22 microtúbulos longitudinales dispuestos en intervalos regulares (Nichols y Chiappino, 1987; Morrissette y col, 1994). El complejo apical está relacionado con la motilidad del parásito y con el proceso de invasión de la célula huésped (Bonhomme y col, 1992).

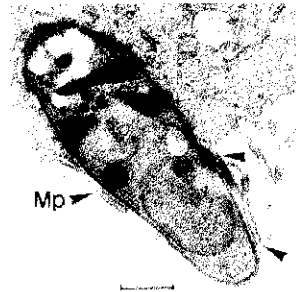
En el interior del microorganismo se observan los toxonemas o roptrias, que son una decena de organelas secretoras con aspecto de bolsa o maza en sentido anteroposterior, los micronemas, los gránulos electrodensos, la mitocondria, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El núcleo esférico, de 1 a 2 μm de diámetro con membrana y nucleolo, es visible en la mitad posterior del parásito y encierra al menos 10 cromosomas. En la parte posterior del parásito se distinguen gránulos de amilopectina.

En la figura 1 se muestra la morfología de los diferentes estadios del parásito.

El estadio de taquizoíto ha sido bien estudiado, de forma que determinados grupos de moléculas asociadas con organelas específicas han sido identificados con anticuerpos monoclonales, siendo en algunos casos clonadas. Dentro de éstas se incluyen cinco proteínas de superficie del taquizoíto, algunas proteínas de las roptrias, ocho moléculas de los gránulos densos y tres de los micronemas (Smith, 1995), expuestas en la tabla 1.



Taquizoíto



Bradizoíto



Esporozoíto



Ooquiste

Figura 1. Morfología de los diferentes estadios de *T.gondii*.

Taquizoíto. a, sección longitudinal de taquizoíto; dg, gránulos densos; c, conoide; m, micronemas; n, núcleo; r, róptrias (Smith, 1995).

Bradizoíto. Mp, proyección de membrana (Sasono y Smith, 1998).

Esporozoíto. pv, vacuola parasitófora; gd, gránulos densos; go, complejo de Golgi (Dubey y col., 1998).

Ooquiste. Dos esporoquistes rodeados por la membrana y pared del ooquiste (Speer y col., 1998).

Tabla 1. Principales moléculas descritas en *T. gondii*

Molécula	Kd	Localización	Referencia
SAG1 (P30)	30	Superficie del taquizoíto	Burg y col., 1988
SAG2 (P22)	22		Prince y col., 1990
SAG3 (P43)	42		Cesbron-Delauw y col., 1994
SAG4	23		Couvreur y col., 1988
SAG5	35		Couvreur y col., 1988
GRA1	22-27	Gránulos densos	Charif y col., 1990
GRA2	28.5		Cesbron-Delauw, 1994
GRA3	30		Mercier y col., 1993
GRA4	40		Mevelec y col. 1992
GRA5	21		Lecordier y col., 1993
GRA6	32		Cesbron-Delauw, 1994
GRA7	29		Bonhomme y col. 1998, Jacobs y col. 1998
NTP1	63		Asai y col., 1983, Sibley y col., 1994
ROP1	60	Roptrias	Ossorio y col., 1992 Sadak y col., 1988
ROP2-3	55-59		Leriche y Dubremetz, 1991
ROP4	60		Herion y col., 1993
ROP5	59.5		Smith J.E. 1995
ROP6	42		Smith J.E. 1995
ROP7	57-60		Smith J.E. 1995
ROP8	200		Smith J.E. 1995
MIC1	60	Micronemas	Achbarou y col., 1991
MIC2	120		Morrisette y col., 1994
MIC3	90		Morrisette y col., 1994

El taquizoíto es capaz de invadir de forma activa las células nucleadas del hospedador, donde se dividen asexualmente por endodiogenia (formación de dos células hijas dentro de una célula progenitora con destrucción final de esta última, del griego *endon*=dentro y *dyo*=dos) en el interior de una vacuola parasitófora que les aísla del citoplasma de la célula invadida. Tras sufrir varias divisiones, la célula se rompe liberando los nuevos taquizoitos (Frenkel 1988).

2.1.1. Mecanismos de invasión y desarrollo intracelular.

El proceso de invasión de la célula huésped por el taquizoíto es complejo y, aunque se ha avanzado en su conocimiento en los últimos años, aún quedan muchos aspectos por confirmar. La invasión está formada por diferentes etapas dirigidas por el parásito. En una etapa preliminar se produce la adherencia del parásito a receptores de membrana de la célula huésped, ya que la membrana externa del taquizoíto compromete a múltiples receptores de membrana en el ataque a diferentes células (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998). Tras la adhesión, el ingreso de *T.gondii* en la célula se produce en 20-40 segundos, por medio de movimientos de torsión y deslizamiento del parásito. Esta motilidad es necesaria durante todo el proceso invasivo y depende de un gradiente de pH determinado por iones extracelulares. La invasión se lleva a cabo cuando el pH interno es mayor que el pH externo (Bonhomme y col., 1998). El movimiento en espiral que realiza el taquizoíto en la penetración se genera en el conoide y los microtúbulos, involucrando a la actina (Endo y col., 1988), miosina (Schwarztmann y Pfeferkorn, 1983) y la calmodulina, proteína mediadora de los procesos Ca^{2+} dependientes (Pezzella y col., 1997).

Las proteínas de superficie parasitaria están involucradas en el proceso de invasión. Existen cinco principales proteínas en la membrana externa de *T.gondii* (SAG1-5), que se encuentran ancladas por moléculas de tipo glicosilfosfatidil-inositol (GPI) en la membrana plasmática. Las GPIs también se consideran relacionadas con funciones mecánicas, de transferencia de proteínas y señal de transducción, de significación aún no bien conocida en la patogénesis de la infección (Lüder y Gross, 1998).

Las proteínas de superficie SAG1 y SAG2 son específicas del taquizoíto (Soete y col., 1993) y fundamentales en el proceso inicial de invasión de la célula, principalmente en la adhesión a la membrana de la célula huésped (Smith, 1995, Manger y col., 1998a); además, parece que el antígeno SAG2 está involucrado en la motilidad y en la reorganización durante el proceso de invasión (Lüder y Gross, 1998). El antígeno SAG3 también participa en el ataque e invasión celular y comparte una homología considerable con SAG1 (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998).

Una vez que el parásito se encuentra orientado apicalmente sobre la membrana celular, se produce la secreción de proteínas procedentes del micronema (MIC 1-3) que se unen a la membrana, seguidas de la liberación de proteínas de las roptrias. Las roptrias

excretan factores que disminuyen la viscosidad de la membrana de la célula huésped, inician su invaginación y facilitan la penetración del parásito (Bonhomme y col, 1998). El taquizoíto finalmente se encuentra dentro de la célula rodeado de una vacuola parasitófora que favorece su replicación y que difiere del fagosoma clásico, ya que no es acidificada y los lisosomas no se fusionan con ella (Sibley y col., 1994).

En el interior de la vacuola se secretan las proteínas de los gránulos densos (GRA1-7) que elaboran un retículo intravacuolar, compuesto de túbulos de membrana, que permite una conexión entre el espacio intravacuolar y la membrana. Las proteínas GRA han sido relacionadas con la supervivencia intracelular del parásito y los mecanismos de intercambio de nutrientes con la célula hospedadora. Algunas de estas proteínas se han observado en el interior de la célula huésped, confiriéndose a las proteínas GRA un papel importante en la replicación parasitaria y la evasión de la respuesta inmune (Jacobs y col., 1998).

Otro factor involucrado en el proceso de invasión es el ión Ca^{2+} . Estos iones son mediadores de respuesta tanto de señales extracelulares como de procesos intracelulares, incluyendo los relacionados con la regulación de la formación del citoesqueleto o la secreción y síntesis de proteínas. El proceso de invasión de *T.gondii* depende de la movilización de Ca^{2+} del medio extracelular e intracelular (Pingret y col. 1996).

Las fosfolipasas A2 también favorecen el proceso de invasión ya que son enzimas que hidrolizan los fosfolípidos de membrana. Se han encontrado fosfolipasas A2 secretoras en los orgánulos secretores de gránulos densos, roptrias y en el complejo de membrana, sugiriéndose su participación en el proceso de invasión y en la formación de la vacuola parasitófora (Bonhomme y col., 1998).

2.2. BRADIZOÍTOS.

Los bradizoítos (del griego *bradi*=lento), se desarrollan a partir de los taquizoítos tras el establecimiento de la respuesta inmune del hospedador. Están incluidos en formas quísticas tisulares que son formaciones redondeadas, pudiendo adoptar formas poligonales por la presión ejercida por los tejidos próximos; miden de 10-200 μm y tienen membrana argirófila. Algunos de los quistes contienen hasta 3000 bradizoítos.

Éstos son algo menores que los taquizoítos pero de estructura similar y se dividen lentamente por endodiogénesis en el interior del quiste tisular durante la fase crónica de la infección (Ferguson y col 1994).

Los factores que influyen en la conversión del taquizoíto en bradizoíto en la fase crónica o de bradizoíto en taquizoíto en la reactivación dentro del hospedador intermediario, están en estudio (Gross y col., 1996; Lüder y Gross 1998). Se ha considerado el papel del sistema inmunitario, con la actuación de agentes inmunomoduladores como el interferón- γ y el óxido nítrico (NO), asociados a la formación y estabilización de quistes de bradizoítos (Suzuki y col., 1996). También se han señalado factores relacionados con la respuesta general del medio al estrés originado por la invasión, como son el aumento del pH, temperatura, fármacos antimitocondriales y la actuación del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Smith y col., 1997).

En el mecanismo de conversión de un estadio en otro influyen igualmente factores genéticos del parásito, observándose que cepas virulentas, como la RH, muestran una tasa de conversión taquizoíto-bradizoíto mucho menor que las cepas avirulentas (Smith, 1995).

El análisis ultraestructural revela que los bradizoítos difieren de los taquizoítos en un mayor contenido de los micronemas y gránulos de amilopectina (Ferguson y Hutchison, 1987), y una localización terminal del núcleo mientras que en los taquizoítos es central (Dubey y col., 1998). Así mismo, se han descrito proteínas específicas de los bradizoítos codificadas por genes que se expresan en el estadio de bradizoíto (Bohne y col., 1995, Manger y col., 1998b). El proceso de diferenciación de taquizoíto a bradizoíto pasa por un estado intermedio en el que se coexpresan antígenos específicos de taquizoíto y bradizoíto (Gross y col., 1996). En la tabla 2 se muestran las proteínas específicas de los bradizoítos.

Tabla 2. Moléculas protéicas específicas de bradizoíto.

<i>Molécula</i>	<i>Kd</i>	<i>Localización</i>	<i>Referencia</i>
MAG1	65	Matriz quística	Parmley y col., 1994
Pb21	21	Superficie de bradizoíto	Tomavo y col., 1991
Pb36	36	"	Tomavo y col., 1991
Pb34	34	"	Tomavo y col., 1991
Pb18	18	"	Tomavo y col., 1991
Pb30	30	Citoplasma	Weiss y col., 1992
Pb29	29	"	Zhang y Smith, 1995
Pb116	116	Pared quística	Weiss y col., 1992

La formación del quiste se origina por la actividad de los bradizoítos que segregan una serie de sustancias que se depositan en la membrana de la vacuola parasitófora, originada en el proceso de invasión, y posteriormente precipitan. A medida que los bradizoítos se multiplican, la vacuola aumenta de tamaño hasta que se produce la fusión de las granulaciones de la membrana vacuolar, momento en el que ésta se hace más resistente y pasa a llamarse membrana o pared del quiste. Aunque los quistes pueden desarrollarse en cualquier órgano, las localizaciones más frecuentes son el músculo esquelético estriado y cardíaco, el sistema nervioso central, pulmón y bazo, donde pueden persistir en fase de latencia durante toda la vida del hospedador (Lüder y Gross, 1998).

Las enzimas digestivas (pepsina y tripsina) rompen la pared del quiste, pero los bradizoítos liberados son viables alrededor de 2 horas en pepsina y 6 horas en tripsina, lo que permite su supervivencia en un periodo de digestión normal. La congelación y descongelación, la desecación y las secreciones gástricas (pepsina, ácido clorhídrico) son letales para los taquizoítos, destruyéndose en poco tiempo en el jugo gástrico y en 4-5 horas en el intestinal (Remington y Desmonts 1983).

La resistencia a la digestión gástrica ha sido utilizada como criterio de diferenciación entre bradizoíto y taquizoíto (Frenkel, 1996), pero últimamente se ha comprobado la supervivencia de taquizoítos durante una hora en una solución de tripsina al 0,5% y hasta dos horas en ácido peptídico (Dubey, 1998).

Los quistes dejan de ser infectantes por la acción del calor (>60°C), por la desecación, salazón o bien por la congelación a -20°C, aunque se ha demostrado la supervivencia

de éstos a 4°C y NaCl al 0,85% durante 56 días y en una solución de NaCl al 3% durante 21 días, reduciéndose la supervivencia a 14 y 3 días respectivamente si se mantienen a 20°C (Dubey, 1997).

2.3. ESPOROZOITOS.

Los esporozoitos presentan una morfología similar a los taquizoitos y se desarrollan dentro de los ooquistes. El ooquiste es la forma de resistencia en el medio exterior, resultante del ciclo gametogónico o sexuado del parásito que tiene lugar en el intestino del gato y otros félidos salvajes. Son elementos ovoides de 10-13 µm de diámetro, limitados por una membrana gruesa y resistente y contienen ocho esporozoitos. Los esporozoitos maduran en presencia de oxígeno y a una temperatura inferior a la temperatura corporal de los felinos. Los ooquistes pueden permanecer infectivos en el suelo durante meses, incluso más de un año en condiciones favorables (Frenkel y col., 1975), pudiendo contaminar también el agua. Se ha observado la persistencia de la infectividad después de 106 días a -5°C y -10°C y durante 54 meses a 4°C (Dubey, 1998b). La resistencia a condiciones extremas es una característica de este estadio del parásito, que no es destruido por ácidos ni álcalis ni detergentes comunes de laboratorio (Evans 1992).

Tras la ingestión de los ooquistes por el animal huésped, los esporozoitos son capaces de invadir las células y formar una vacuola parasitófora. El único estadio del parásito capaz de replicarse en las células de los huéspedes intermediarios es el taquizoito por lo que el esporozoito debe transformarse en éste. En estudios realizados en ratón se observó que el esporozoito pasa a través de los enterocitos y epitelio del ileon y entra en la lámina propia infectando diversos tipos de células transformándose en taquizoito (Speer y Dubey, 1998). Se ha observado que para que se lleve a cabo la replicación es necesario que se exprese proteínas específicas de los taquizoitos (Speer y col 1995).

2.4. CICLO BIOLÓGICO DE *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma presenta uno de los ciclos biológicos más versátiles y eficaces, con la práctica totalidad de los mamíferos y de las aves como hospedadores intermediarios. En un principio sólo se observó el desarrollo asexual del parásito consistente en la

infección por ingestión de quistes presentes en la carne de animales crónicamente infectados. A principios de los 70 se descubrió que el gato, además de ser un huésped intermediario, ya que en sus tejidos se forman quistes tisulares con bradizoítos, también era el huésped definitivo de *T.gondii* (Frenkel y col., 1970).

Por lo tanto, en el desarrollo de *T.gondii* se pueden distinguir dos tipos de ciclos: el ciclo enteroepitelial, que se desarrolla en el epitelio intestinal del hospedador definitivo (gato y otros felinos) y el ciclo extraintestinal que puede desarrollarse en el hospedador definitivo y en los hospedadores intermediarios.

En el ciclo entero epitelial, también llamado sexual por presentar esta fase del desarrollo del parásito, ocurre la infección de los gatos por ingestión de cualquiera de los tres estadios infectantes del parásito (taquizoítos, quistes tisulares con bradizoítos y ooquistes con esporozoítos). Principalmente con los quistes presentes en la carne de una presa infectada, los bradizoítos invaden la superficie epitelial del intestino y se diferencian en macro y microgametos. Estos últimos salen de las células infectadas y se fusionan con los macrogametos originando ooquistes diploides que desarrollan una gruesa pared impermeable. El ciclo sexual concluye con la expulsión, junto con las heces, de estos ooquistes de gran capacidad infectiva para cualquiera de los huéspedes intermediarios (Freyre, 1998).

Los gatos emiten ooquistes tres a diez días después de la ingestión de quistes tisulares (Dubey y Frenkel, 1972), a partir de 19 días tras la ingestión de taquizoítos (Dubey y Frenkel, 1976) y a los 18 días después de la ingestión de ooquistes (Dubey, 1996). La liberación de ooquistes en las heces se efectúa durante 2 o 3 semanas (10^7 ooquistes en una semana tras la primera infección) y la reinfección posterior no suele dar lugar a una nueva eliminación de éstos (Evans, 1992), por lo que los gatos jóvenes presentan un mayor riesgo de eliminación de ooquistes que los viejos (Luder y Gross, 1998). No obstante, se ha demostrado la emisión de ooquistes en gatos reinfectados a los 77 meses de la primera infección (Dubey, 1995), al igual que la reinfección en gatos jóvenes y desnutridos puede ocasionar la eliminación de ooquistes por segunda vez (Frenkel, 1998b).

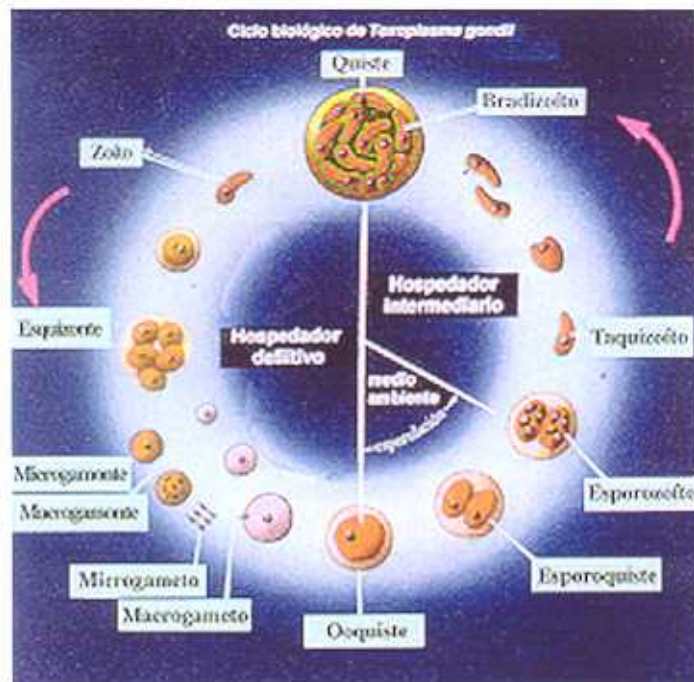
En el ciclo extraintestinal o asexual se origina el desarrollo del parásito con la formación sucesiva de los estadios de taquizoíto y bradizoíto. Suele originarse por la ingestión de ooquistes (por contacto directo con el gato o por contaminación de frutas y verduras) o de quistes tisulares (por ingestión de carne cruda o poco cocida), ya que los taquizoítos

carecen prácticamente de significación epidemiológica al ser muy lábiles frente a factores ambientales comunes como la temperatura, la desecación y la presión osmótica, y la acción de los jugos gástricos (Freyre, 1998). No obstante, el parásito ha sido aislado de leche de hembras de ratones, bóvidos, cerdos, perros y óvidos infectadas experimentalmente, cuestionándose la posible penetración por la faringe de los taquizoítos presentes en la leche y su diseminación vía linfática (Johnson, 1997).

Tras la ingestión, los zoítos (bradizoíto o esporozoíto) son liberados de la pared quística en el intestino delgado por la acción de diversos enzimas proteolíticos, induciéndose su transformación en taquizoítos. Éstos penetran sucesivamente en las células del epitelio intestinal y de los ganglios linfáticos adyacentes. La multiplicación dentro de la vacuola parasitófora origina a las 24 horas la rotura de las células con la liberación de los taquizoítos que invaden nuevas células. Tras un período de multiplicación en los ganglios mesentéricos, los taquizoítos pasan al torrente circulatorio invadiendo nuevas células en diversos tejidos hasta que se establece la respuesta inmune del hospedador, induciéndose la transformación a bradizoíto o forma de resistencia.

Otras formas de transmisión son por vía transplacentaria, cuando la infección de la madre se produce durante la gestación (Wong y Remington 1994), por transfusiones y trasplantes de órganos (Wreghitt y col., 1989) y las infecciones accidentales sufridas por personal de laboratorio (Beaman y col., 1995). En la figura 2 se presenta el ciclo biológico y el epidemiológico.

Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*



Ciclo epidemiológico de *Toxoplasma gondii*

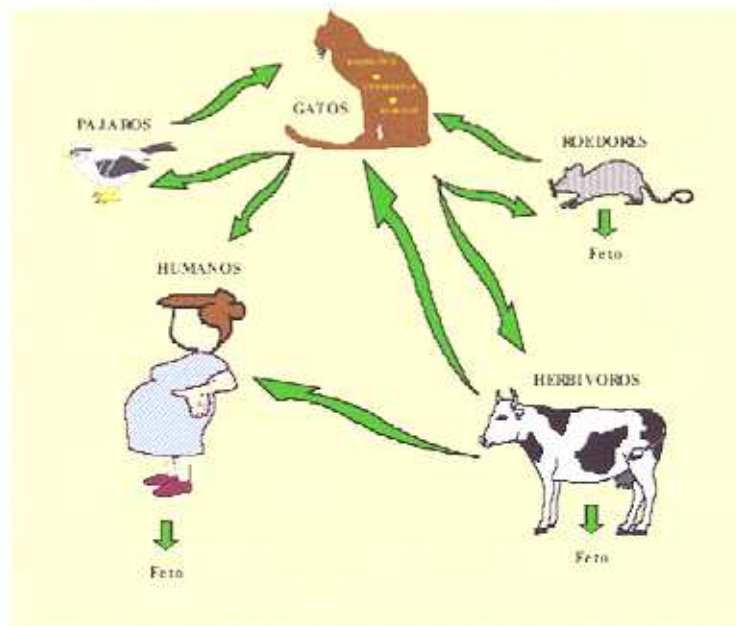


Figura 2. Ciclo biológico (Luzón y col., 1997) y Ciclo epidemiológico de *Toxoplasma gondii*.

3.- RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR.

La respuesta humoral establecida frente a *Toxoplasma gondii* confiere sólo una protección parcial, siendo la respuesta celular la que origina un mayor factor de resistencia en el hospedador.

En la respuesta humoral de la fase aguda se origina un elevado nivel de anticuerpos IgG, descendiendo gradualmente hasta llegar a un título estable hacia los dos años. Las subclases involucradas son de tipo IgG1, aunque pueden observarse bajos niveles de IgG2 e IgG3, no apareciendo IgG4 (Huskinson y col., 1989). Las inmunoglobulinas IgM aparecen en la primera semana de la infección y desaparecen en uno o dos meses, aunque en muchos casos se han detectado durante varios meses, incluso años (Joss, 1992; Domingo, 1996; Lappalainen y col., 1993; Holliman y col., 1994; Jenum y col., 1997; Gutiérrez y col., 1997; Benítez y col., 1998). Los anticuerpos IgE aparecen pronto, a la vez que las IgM, precediendo a la presentación de las IgA, y desaparecen como máximo a los cuatro meses (Bonhomme y col., 1992).

Los anticuerpos IgG revelan el complejo patrón de antígenos, ya que reaccionan con muchos polipéptidos con un extenso rango molecular, especialmente de 30 a 60 kDa; en cambio, los anticuerpos IgM reconocen pocos polipéptidos de 6, 25 y 35 kDa, al igual que las inmunoglobulinas IgA que reaccionan con pocos polipéptidos de 25, 35 y 50 kDa (Sharma y col., 1983). El antígeno SAG1, la mayor proteína de superficie del parásito, induce una respuesta poliisotípica de anticuerpos IgG, IgM, IgA e IgE (Santoro y col., 1985). Los anticuerpos contra SAG1 inhiben la infección al bloquear la unión del parásito con los receptores de las células del huésped (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998).

La respuesta mediada por células es el mecanismo principal para el control de la infección en sujetos inmunocompetentes. Durante la respuesta aguda las células *natural killer* (NK) actúan como elementos esenciales en los mecanismos de defensa del hospedador. Después de varios días de infección se desarrollan las células T específicas contra el parásito, esenciales para la protección a largo plazo. Las células T CD4⁺ parecen actuar de forma sinérgica con las CD8⁺, que son esenciales para la protección del hospedador (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998).

En la respuesta inmune es reconocido el papel clave desarrollado por las citoquinas y quinasas. Las citoquinas son glicoproteínas producidas por las células del sistema inmunitario que actúan en los procesos de inmunorregulación y defensa del hospedador.

Ciertos estudios realizados en el modelo murino y en líneas celulares humanas han determinado que las citoquinas de tipo 1 (Th1), tales como interferón- γ (IFN- γ), interleuquinas 2 y 12 (IL2 y IL12) y factor de necrosis tumoral (TNF- α), median una respuesta inmunitaria protectora contra la infección por *Toxoplasma gondii*. El IFN- γ actúa de forma sinérgica con el TNF- α , estimulando la emisión de NO, que afecta al crecimiento del parásito por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial que lleva a decrecer la tasa de replicación e induce la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto (Gross y col., 1997). Por otra parte las citoquinas de Tipo 2 (Th2), como la IL10, IL6 e IL4, son necesarias para regular una respuesta Th1 excesiva que puede ser nociva para el hospedador (Gazzinelli y col., 1996).

Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato a residuos de serina, treonina o tirosina en las cadenas polipeptídicas. La red de quinasas se encuentran involucradas en los mecanismos de transducción de señal en las células eucariotas. La fosforilación de un residuo aminoacídico origina un cambio conformacional que induce una activación o una inhibición de la función de la proteína (Gómez-Marín y col., 1998a; Gómez-Marín y col., 1998b). Aproximadamente 2-3% de los genes de las células eucariotas codifican alguna quinasa. Las quinasas MAP (*Mitogen Activated Protein Kinase*) son quinasas que fosforilan residuos de serina y treonina. Actúan en cascada y activan proteínas fosfolipasas nucleares y citosólicas, siendo consideradas como componentes críticos de un control celular central que coordina las señales generadas por numerosos mediadores intra y extracelulares (Li y col., 1993). *T.gondii* posee una fosfolipasa A2 (PLA2) específica cuya actividad se ve aumentada durante la infección. Se ha observado la participación de las quinasas MAP en los mecanismos de transducción de señal de la infección parasitaria. El IFN- γ afecta directamente a la actividad de las quinasas MAP del parásito disminuyéndola, por lo que confiere una señal protectora frente a *T.gondii* (Gómez-Marín y col., 1998a; Gómez-Marín y col., 1998b).

4. TOXOPLASMOSIS ANIMAL

El importante papel desarrollado por el gato y otros felinos como hospedadores definitivos ha sido destacado anteriormente. Los hospedadores intermediarios de *T.gondii* incluyen animales herbívoros, carnívoros y omnívoros. La infección animal se ha comprobado en más de 200 especies de mamíferos y aves. En el medio natural, la

infección se presenta, principalmente, en las aves silvestres y en los roedores y, en el entorno doméstico en el ganado ovino, caprino y porcino. Estos animales pueden ser infectados por transmisión congénita, por carnivorismo y por ingestión de ooquistes. En todos ellos la ingestión de ooquistes representa la principal fuente de infección, por lo que son los gatos jóvenes, ya que el número de gatos con infección activa disminuye con la edad, los que tiene una mayor importancia epidemiológica, especialmente los gatos vagabundos o de la propia explotación que se alimentan con aves y roedores (Luzón y col., 1997). Las heces de gatos que contaminan los alimentos almacenados es una de las principales fuentes de infección para los animales de granja (Dubey, 1998a). Se estima que la dosis mínima infectante en el ganado ovino se halla alrededor de 200 ooquistes y se ha calculado que 50 gramos de heces de gato repartidos en unas 10 toneladas de pienso equivaldrían a unas 25 dosis infectantes por Kg para esta especie animal. El abonado natural de los pastos con estiércol procedente de granjas y apriscos puede ser también una fuente común de infección para las ovejas adultas (Luzón y col., 1997). Los invertebrados coprófagos pueden servir ocasionalmente de transporte mecánico de ooquistes (Frenkel, 1998 b).

El régimen de explotación también puede influir en la transmisión de la toxoplasmosis en los pequeños rumiantes ya que en estudios realizados en Australia, Gran Bretaña y España se han detectado tasas de infección significativamente mayores en las granjas de manejo intensivo que en las de extensivo, al existir una mayor exposición de los animales en explotación intensiva a alimentos, agua y cama contaminados (Pereira-Bueno y Ortega-Mora, 1997, Luzón y col., 1997).

Toxoplasma gondii causa muerte embrionaria, muerte fetal y momificación o aborto, mortinatos y muerte neonatal en ovejas y cabras y, raramente, en cerdos y otros animales. El aborto inducido por la toxoplasmosis ocurre en hembras de todas las edades, que adquieren la infección durante el embarazo (Dubey, 1998 b). La primoinfección por *T.gondii* confiere en la especie ovina una fuerte inmunidad que impide la infección del feto en gestaciones posteriores, evitando la repetición de abortos en las ovejas que ya lo padecieron. Sin embargo, existen evidencias que indican que en el ganado caprino puede repetirse el aborto en gestaciones sucesivas (Luzón y col., 1997). Las hembras suelen permanecer clínicamente asintomáticas y en el feto no aparecen lesiones patognomónicas, sin embargo se observan lesiones características en la placenta en la mitad de las ovejas y cabras infectadas. *T.gondii* produce una necrosis característica en los cotiledones placentarios con forma de vetas blancas o

múltiples nódulos blanco-grisáceos hasta de dos milímetros de diámetro, no afectando a todos los cotiledones en el mismo grado (Beverley y col., 1971).

La infección de suídos también tiene importancia, sobretodo por su repercusión en la salud pública. Se han realizado estudios en cerdos criados en extensivo y en granjas industriales. Dubey y col.,(1995) en un estudio realizado en granjas porcinas de Illinois, encontraron que la mayor seroprevalencia se asociaba con el acceso de los gatos a las cerdas. La seroprevalencia a *T.gondii* en cerdos adultos aumentaba cuando mayor era el número de gatos juveniles en la granja y mayor la seroprevalencia en los gatos caseros. La cría al aire libre no se asociaba con una seroprevalencia mayor (Dubey y col., 1995; Weigel y col. 1995).

La infección en ganado bovino y caballar es menos común que en otros animales para carne y, aunque se han encontrado infectados por *T.gondii*, no se han obtenido apenas estudios de toxoplasmosis clínica en estas especies animales, permaneciendo la mayoría asintomáticos (Dubey,1998c).

Se han observado brotes de toxoplasmosis en zoológicos, afectando especialmente a animales exóticos como los primates, los marsupiales australianos y los mamíferos de Madagascar. La vulnerabilidad a la infección clínica, a menudo fatal, puede explicarse por su evolución en un ambiente sin gatos y sin exposición a la infección durante generaciones (Dietz y col., 1997).

El perro también puede padecer la infección, de forma asintomática o presentando trastornos respiratorios, alteraciones digestivas y nerviosas. Se ha observado en estudios epidemiológicos una alta correlación del contacto con perros con la seroconversión en personas, sin descubrir ooquistes en las heces de los perros después de una primoinfección, determinándose que algunos perros comen heces de gato y retozan en ella, pudiendo transmitir los ooquistes por el contacto con el pelaje contaminado (Miller y col., 1972, Frenkel , 1998b).

Las seroprevalencias de toxoplasmosis obtenidas en diferentes especies animales varían según las áreas geográficas, incluso dentro del mismo país, y la diferente sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas empleadas en los estudios. En la tabla 3 se exponen algunas seroprevalencias encontradas en diferentes estudios.

Tabla 3. Seroprevalencia de la toxoplasmosis en las principales especies domésticas en diferentes países.

<i>Especie</i>	<i>País</i>	<i>Seroprevalencia (%)</i>	<i>Referencia</i>
Ovinos	España	12-57,6	Moreno y col.,1991a Mainar y col., 1996, Marca y col.,1996; Quintanilla-Gonzalo y col.1997a; Solá y col. 1997
	Francia	15-72	Gillo y Desmonts,1961, Ramisse y col., 1981
	Reino Unido	23-90	Beverly y Watson,1961 Beverly y Machkay, 1962
	Suecia	19	Lunden y col., 1992
	EE.UU.	24-74	Dubey,1990
	Uruguay	38,5	Freyre y col., 1996
	Nueva Zelanda	48	Opel y col., 1991
	Australia	41-62	Munday y Corbould, 1979
Caprinos	España	14,3-63	Rodriguez Ponce y col., 1995; Quintanilla-Gonzalo y col., 1997b
	Francia	46	Calamel, 1982
	EE.UU.	23	Rupanner y col., 1978
	Irán	19	Hashemi-Fesharki, 1996
Súidos	España	11-44	Moreno y col., 1985
	EE.UU.	16	Dubey, 1998 ^a
	Alemania	53	Hoffmann, 1996
	China	10	Lin y col., 1990
Vacunos	España	8-43	Moreno y col., 1991b
	Argentina	64	Wyne de Martini y Martín, 1977
Gatos	España	63,7	Alonso y col., 1997

La toxoplasmosis animal tiene una gran repercusión económica, debido a las pérdidas por los abortos originados, pero aún más importante es la repercusión sanitaria al presentarse como principal fuente de infección para los humanos. En Europa se considera que el 50% de la carne ovina y porcina está parasitada, aunque en otras

áreas, como EE.UU., el porcentaje de corderos infectados destinados al consumo no supera el 5%, siendo mayor la infección porcina (Luzón y col.,1997). El papel de diseminación de la toxoplasmosis por infección en gatos y la contaminación ambiental subsiguiente con ooquistes origina una importante fuente de infección para el hombre.

5. TOXOPLASMOSIS HUMANA

La toxoplasmosis es una enfermedad común en el hombre, con un amplio espectro de sintomatología clínica que abarca desde una infección asintomática hasta un cuadro grave que puede llegar a ser mortal. Dado que muchos casos no muestran síntomas o éstos son leves, la mayoría de los casos no son diagnosticados. Hay que destacar la diferenciación de la enfermedad en personas inmunocompetentes y en diversos grupos de riesgo como son los casos congénitos y los afectados inmunocomprometidos.

No se tienen datos precisos del periodo de incubación, pero por los brotes de infección estudiados, se supone entre 4 y 21 días, presentando mayor sintomatología en la segunda semana después de la infección (Ho-Yen, 1992a).

5.1 TOXOPLASMOSIS EN PACIENTES INMUNOCOMPETENTES.

Las infecciones agudas en pacientes inmunocompetentes suelen ser asintomáticas. Cuando aparecen signos clínicos (10-20% de las infecciones) consisten en linfadenopatías de los ganglios cervicales, suboccipitales y supraclaviculares. En los casos más agudos puede producirse un malestar general similar al producido en procesos gripales con febrícula, cefalea y cansancio. Menos del 20% de los individuos con adenopatías presentan algún otro tipo de manifestaciones como puede ser artralgias, mialgias, dolor faríngeo, abdominal y erupción maculopapular (Mawhorter y col., 1992). Ocasionalmente puede existir hepatoesplenomegalia y son raras las neumonitis transitorias, el derrame pleural, pericarditis, miocarditis y meningoencefalitis. Se han presentado casos de coriorretinitis en adultos tras una infección aguda (Montoya y Remington, 1996, Marjolein y col., 1995, Choi y col., 1997).

El curso clínico de la infección suele ser benigno y autolimitado. Una vez superada la fase aguda de la infección, al cabo de pocas semanas y excepcionalmente al cabo de un año, los pacientes permanecen infectados durante el resto de sus vidas, persistiendo

la infección en forma de quistes localizados en múltiples órganos y tejidos (Ho-Yen, 1992a).

5.2. TOXOPLASMOSIS EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS

La toxoplasmosis constituye una grave y frecuente infección oportunista en pacientes inmunodeprimidos bien por la existencia de un defecto en su inmunidad o por distintas causas como pueden ser tratamientos farmacológicos (corticoides), quimioterapia antitumoral (Hakes y Armstrong, 1983; Arnold y col., 1997), agentes inmunosupresores en receptores de trasplantes de órganos (Peacock y col., 1995; Yadlapati y col., 1997; Brinkman y col., 1998; Cuturic y col., 1997; Chandrasekar y Momin, 1997), transfusiones (Siegel y col., 1971; Ho-Yen 1992b) o bien en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998).

La infección aguda en dichos pacientes presenta manifestaciones clínicas extensas y generalizadas, pudiendo aparecer fiebre, cefalea, hepatoesplenomegalia, neumonía, miocarditis y alteración del sistema nervioso central. Más frecuente que la infección aguda primaria es la reactivación de formas quísticas crónicas de *T.gondii* con liberación de trofozoítos. Los síntomas y signos de la toxoplasmosis reactiva en dichos enfermos dependen de la localización de los quistes que se rompen y la reacción inflamatoria que resulta (Ho-Yen, 1992b). La afección más común es la toxoplasmosis encefálica (TE), seguida por la pulmonar y la coriorretinitis.

El mayor número de casos de toxoplasmosis en personas inmunodeprimidas se presentan en personas con SIDA. La reactivación de toxoplasmosis crónica origina principalmente una afectación cerebral, y en un 2% se presenta como toxoplasmosis extracerebral multivisceral, afectando a pulmón, ojo y corazón, pero también con diversas localizaciones como en músculos, tracto gastrointestinal, hígado, riñón, genitales y vejiga (Gross, 1996, Besnier y col., 1995, Arnold y col., 1997).

El 33% de los pacientes con toxoplasmosis diseminada tienen afectación pulmonar (Pomeroy y Filice, 1992, Asensi y col, 1993). Se presenta como un cuadro de neumonía, disnea, tos y fiebre, con hallazgo radiológico de patrón intersticial.

En la actualidad la toxoplasmosis está señalada como la principal infección oportunista del sistema nervioso central, afectando de un 3 a un 40% de los pacientes con SIDA en

algún momento de su evolución, según la prevalencia de la enfermedad en el área geográfica estudiada. Así en EE.UU. entre un 10-40% de los individuos con SIDA presentan toxoplasmosis crónica, desarrollando TE entre un 3% y un 13%. En Europa la prevalencia de la enfermedad es mayor y se estima que entre el 25% y el 50% de los pacientes con SIDA y toxoplasmosis latente desarrollará TE (Luft y Remington, 1992). En España afecta al 20-25% de los pacientes con SIDA en algún momento de su evolución y, según los datos del Registro Nacional del SIDA, la toxoplasmosis cerebral ha sido la enfermedad indicativa de SIDA en el 11% de los casos (Plan Nacional sobre el SIDA, 1994).

Antironi y col., en un estudio realizado en 136 enfermos VIH+ con lesiones cerebrales focales, observaron que la probabilidad de TE era de 0,87 en los pacientes seropositivos a *Toxoplasma* que no recibían profilaxis frente al parásito, disminuyendo al 0,59 en los que recibían terapia específica (Antironi y col., 1997).

La incidencia de la TE toxoplásmica en los pacientes infectados con VIH está relacionada con recuentos de linfocitos T CD4⁺ inferiores a 100 cel./mm³. Zufferey y col. (1993) observaron que de los pacientes estudiados que desarrollaron TE, el 57% presentaba valores de CD4⁺ inferiores a 50 cel./mm³, un 22% entre 50 y 100 y un 15% entre 100 y 200, encontrando sólo un 6% con valores superiores a 200 cel./mm³. Se estima que los pacientes con SIDA seropositivos a *Toxoplasma* y con valores de CD4⁺ inferiores a 100 cel./mm³ presentan un riesgo de desarrollar TE entre el 10 y 50% (Richards y col., 1995).

No está claro por qué sólo un 50% de los pacientes coinfectados con VIH y *Toxoplasma* desarrollan TE. Estudios recientes demuestran que la reactivación de la toxoplasmosis podría deberse tanto a factores genéticos del hospedador como a variaciones en la virulencia entre diferentes cepas (Kasper y Buzoni-Gatel, 1998; Gross, 1996).

Clínicamente la TE en individuos con SIDA presenta una sintomatología variable, manifestando en algunos casos signos de disfunción neurológica focal y en otros generalizada o difusa, siendo en la mayoría un cuadro compartido inespecífico de disfunción neurológica simultáneamente focal y generalizada (Luft y Remington, 1992; Mariuz y Luft, 1992), similar al observado en otras afecciones encefálicas que ocurren en pacientes VIH positivos (Ho-Yen, 1992; Antironi y col., 1997).

Las manifestaciones de la TE dependen de la localización de los quistes reactivados, de la respuesta inflamatoria y del número y tamaño de las lesiones encefálicas (Lazo,

1998). Los principales cuadros focales son hemiparesia, hemiplejía, convulsiones, ataxia, disminución del campo visual, afasia, que pueden preceder o asociarse a disfunciones neurológicas generalizadas como psicosis, ansiedad, confusión, retraso en las respuestas verbal y motora junto con fiebre y cefalea (Leport y col., 1988; Luft y col., 1993).

En la encefalitis focal, las lesiones anatomopatológicas observadas muestran áreas atróficas y zonas de necrosis múltiples, aunque a veces son únicas, que se localizan en cualquier área cerebral, aunque afecta especialmente a los ganglios basales. Los abscesos tienen una zona central avascular con material de necrosis y una zona exterior hiperémica con infiltrado inflamatorio y taquizoítos libres (Hunter y Remington, 1994). En la encefalitis difusa se observan nódulos microgliales múltiples, a veces con necrosis central, conteniendo en su interior quistes o taquizoítos libres, diseminados en el parénquima encefálico, predominantemente en la sustancia gris (Lazo, 1998).

El diagnóstico, en estos casos, presenta grandes dificultades. Actualmente se basa en criterios clínicos; en hallazgos radiológicos en el que la tomografía axial computarizada (TAC) o la resonancia magnética pueden sugerir encefalitis o lesiones intracerebrales múltiples con crecimiento en forma de anillo, aunque lesiones similares pueden deberse a otras patologías, y en hallazgos serológicos orientativos pues el 97% de los pacientes con TE presentan anticuerpos antitoxoplasma, aunque no se suele detectar IgM ni aumento de IgG (Hullman, 1990; Barker y Holliman, 1992; Acebes y col., 1993; Hellerbrand y col., 1996). El diagnóstico diferencial debe realizarse fundamentalmente con abscesos cerebrales de diversa etiología, principalmente con el linfoma primario cerebral y con menor frecuencia con otras patologías como tuberculosis, otras bacterias piógenas, hongos (*Aspergillus*, *Nocardia*, *Cándida*) criptococomas y cisticercosis entre otros (Ribera Pascuet y col., 1998).

Con los hallazgos presuntivos anteriormente expuestos se instaura el tratamiento específico. Si no se produce respuesta a la terapia indicaría otra patología o habría que realizar una biopsia cerebral para la detección de trofozoítos en un diagnóstico certero. El desarrollo y aplicación de nuevas técnicas diagnósticas menos invasivas se presenta interesante y necesario.

5.3.TOXOPLASMOSIS EN MUJERES EMBARAZADAS.

La primoinfección contraída durante la gestación es –por lo común- asintomática y, en ausencia de un control prenatal, es raramente detectada a lo largo del embarazo. En el 10-20% de las mujeres aparecen signos clínicos inespecíficos, como cansancio, febrícula, linfadenopatía cervical, artralgias y mialgias (Lynfield y Eaton, 1995).

La consecuencia grave es la posible transmisión de la infección al feto, originando serios cuadros congénitos cuando la infección materna es adquirida durante la gestación, aunque en raras ocasiones se han asociado algunos casos de toxoplasmosis congénita con infecciones preconcepcionales en mujeres inmunocompetentes (Forestier y col., 1991) e inmunocomprometidas (Desmonts y col., 1990).

La placenta se infecta durante la fase parasitémica de la madre, la cual se produce, casi en exclusividad, en una infección primaria adquirida durante la gestación y muy raramente por la reactivación de una infección previa al embarazo. La transmisión de los parásitos al feto es de forma inmediata después de la infección materna o con un retraso de semanas, dependiendo de factores modificadores tales como la virulencia de la cepa de *Toxoplasma*, la magnitud del inóculo y el desarrollo de la circulación sanguínea placentaria (Thulliez, 1998a).

El riesgo de infección fetal es menor del 1% si la infección de la madre fue periconcepcional. Se ha observado que la tasa de transmisión e infección del feto incrementa con el tiempo de gestación en el que se adquiere la primoinfección, encontrando un 14% cuando la infección fue adquirida en el primer trimestre, 29% en el segundo y 59% en el tercero (Chatterton, 1992). Si la infección materna es adquirida en las últimas semanas de gestación el riesgo de transmisión es muy alto debido a los cambios originados en la placenta. Diferentes autores han considerado una tasa de transmisión global durante la gestación del 40% (Lappalainen y col., 1992; McAuley y col., 1994; Allain y col., 1998).

El tratamiento temprano de la madre infectada reduce la tasa de transmisión al feto y las secuelas si la lesión intrauterina se ha producido (Hohlfed y col., 1989; Lynfield y Eaton, 1995; Vergani y col., 1998), por lo que se considera de gran importancia un diagnóstico prenatal acertado para la instauración rápida de un tratamiento específico (Hall, 1992; Thulliez, 1998b).

En la actualidad, en España, el control sistemático rutinario para detectar la toxoplasmosis, o el riesgo de padecerla, en las gestantes se lleva a cabo en la mayoría de hospitales y centros de salud. Con estos programas se intenta identificar a las mujeres no inmunizadas para informarles de los riesgos y las medidas específicas a tomar para reducir el riesgo de contaminación (prevención primaria) y el seguimiento serológico de éstas para la detección precoz de una primoinfección. Igual sucede en países como Francia y Austria, sin embargo, existe una gran controversia entre los diversos investigadores entre la conveniencia o no de realizar estos programas generalizados y la relación de coste y beneficio (Hartup y col., 1997; Hall, 1992; Hall, 1994; Schoen y col., 1994; Bader y col., 1997; Tulliez, 1998a).

El diagnóstico en la mujer embarazada se basa en pruebas serológicas para la detección de IgM e IgA específicas y seroconversiones que indiquen una infección reciente y así determinar si la infección se produjo antes o después de la concepción. Sin embargo, la persistencia de las IgM e IgA durante meses, incluso años, no permite confirmarlo, resultando de difícil interpretación los resultados obtenidos (Desmonts y col., 1985; Domingo y col., 1991; Francis y Joynson, 1993; Benítez y col., 1998) por lo que nuevas técnicas diagnósticas están siendo evaluadas como alternativa (Ades, 1991; Grover y col., 1990; Lappalainen y col., 1993; Berrebi y Kobuch, 1994; Hohfeld y col., 1994; Jenum y col., 1997).

5.4. TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA.

La toxoplasmosis congénita es adquirida vía intraplacentaria cuando la madre padece una primoinfección durante la gestación o, de forma poco frecuente, en mujeres embarazadas inmunodeprimidas, tales como coinfectadas con *T.gondii* y VIH, enfermedad de Hodgkin o las sometidas a corticoterapia, en las que se produce una reactivación de la infección crónica (Chatterton, 1992; Lynfield y Eaton, 1995).

La frecuencia de la adquisición de la toxoplasmosis durante la gestación ha sido determinada, en diferentes países, entre 1 y 14 por mil embarazos, originándose una infección congénita en un 0.2 a 2 por mil nacimientos (Tarlow, 1994).

La severidad de las manifestaciones clínicas varía en función del tiempo de gestación en el momento de la infección, la virulencia del parásito y el nivel de resistencia materno-fetal. Cuanto más temprana es la infección en el embarazo existe un riesgo menor de

transmisión al feto, pero cuando ésta se produce los síntomas son muy graves. A medida que la infección se adquiere más tardíamente en la gestación el riesgo de transmisión es mayor pero los síntomas son más leves (Chatterton, 1992). La toxoplasmosis adquirida durante el primer trimestre de embarazo origina abortos, alteraciones multisistémicas en el feto y destrucción del tejido cerebral, mientras que en el segundo y tercer trimestre la severidad de los síntomas decrece. La infección adquirida en el segundo trimestre origina síntomas en 72-79% de los recién nacidos, siendo asintomáticos al nacer el 89-100% de los neonatos que la adquirieron en el tercer trimestre de gestación (Wong y Remington, 1994).

Los neonatos pueden presentar una clínica muy variada, desde síntomas de infección generalizada con hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia, afectaciones pulmonares y cardíacas, hasta alteraciones nerviosas con síntomas como la "triada clásica" con hidrocefalia o microcefalia, calcificaciones intracraneales y coriorretinitis. Estos síntomas son compatibles con los originados en otras infecciones congénitas, como la producida por citomegalovirus (Hall, 1992, Lynfield y Eaton, 1995).

La mayoría de los neonatos con toxoplasmosis congénita son asintomáticos al nacer, pero se ha observado la posterior presentación de complicaciones tanto oculares y auditivas como cerebrales, incluyendo retraso mental y alteraciones psicomotrices (Waleska y col., 1993, McAuley y col., 1994). La toxoplasmosis ocular se presenta, en la mayoría de los casos, como una coriorretinitis y uveítis posterior en adultos originada por una infección congénita. La coriorretinitis congénita suele ser bilateral, mientras que en los raros casos de coriorretinitis por infección aguda suele ser unilateral (Marjolein y col., 1995, Choi y col., 1997).

Es posible tratar a los recién nacidos durante un año con sulfonamida y pirimetamina, encontrándose que el 70% de niños que presentaron alteraciones graves del sistema nervioso central (incluyendo hidrocefalia, microcefalia y calcificaciones intracraneales) y alteraciones oculares al nacer y fueron tratados durante un año se desarrollaron con normalidad (McAuley, 1994). El diagnóstico es importante para identificar a los recién nacido infectados y realizar un tratamiento específico, ya que los retrasos en el diagnóstico y la terapia están asociados en algunos casos con lesiones irreversibles (McAuley, 1994, Forestier y col., 1991, Hohlged y col., 1989).

El diagnóstico prenatal se basa en la detección de IgM e IgA específicas en la sangre fetal y otros indicadores inespecíficos de infección como las IgM totales y γ -glutamyltransferasa (Desmonts y col., 1985). Las pruebas seriadas con ultrasonido

pueden demostrar signos de infección como hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, hepatomegalia o ascitis. Dada la inespecificidad de estas pruebas y que en muchos casos no se producen anticuerpos específicos, el diagnóstico definitivo debe realizarse por la detección directa del parásito en sangre fetal o líquido amniótico por inoculación a ratón o en cultivos celulares, o por técnicas moleculares (Grover y col., 1990, Hohfeld y col., 1994).

El diagnóstico postnatal suele realizarse con pruebas serológicas, pero presenta también numerosos problemas ya que la detección de IgG específicas no es valorable, por la adquisición por vía intraplacentaria de estos anticuerpos maternos, y la ausencia, en un alto porcentaje de recién nacidos, de anticuerpos específicos IgM e IgA, debido a la inmadurez del sistema inmune o a la baja sensibilidad del método diagnóstico (Desmots y col., 1985, Foudrinier y col., 1995), siendo necesario recurrir a la detección directa de *Toxoplasma gondii* por métodos de aislamiento o moleculares (Fuentes y col., 1996, Lynfield y Eaton, 1995).

6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la toxoplasmosis es complicado. El diagnóstico clínico es difícil de establecer dada la ausencia o poca especificidad de la sintomatología, por lo que el diagnóstico se fundamenta en la investigación de la inmunidad humoral y en la detección del parásito.

6.1. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

El diagnóstico inmunológico para la detección de anticuerpos específicos frente a *Toxoplasma* se realiza con un amplio abanico de técnicas serológicas. Existe un elevado número de antígenos diferentes disponibles para la determinación serológica ya que las pruebas pueden utilizar antígenos enteros (vivos, fijados) o extractos antigénicos, purificados o no, que son antígenos solubles de membrana, citoplásmicos, mixtos o excretorios-secretorios, (Thomas y Pelloux, 1998). Los anticuerpos sintetizados en la fase inicial de la enfermedad son, sobre todo, dirigidos contra los antígenos de membrana, por lo que las reacciones que utilizan éstos se hacen positivas más precozmente.

6.1.1. Detección de anticuerpos IgG

Los anticuerpos IgG específicos aparecen en el suero en la segunda semana después de la adquisición de la infección, alcanzando el grado máximo en uno o dos meses, manteniéndose durante un periodo de tiempo variable y disminuyendo progresivamente, si bien persisten títulos detectables durante el resto de la vida del hospedador (Beaman y col., 1995). El método de referencia para su detección es el *dye-test* o prueba de Sabin-Feldman (Sabin y Feldman, 1948) de alta sensibilidad y especificidad, que mide anticuerpos totales, en su mayoría de la clase IgG. Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos específicos de lisar los taquizoítos mediante la activación del complemento después de la formación de los complejos antígeno-anticuerpo en su superficie. Los taquizoítos lisados se observan tras una tinción vital con azul de metileno. Dada la dificultad y el riesgo de trabajar con el parásito vivo esta técnica sólo se realiza en algunos centros especializados, por lo que algunos autores consideran que no puede ser utilizada como un método universal (Petithory y col., 1996).

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de IgG es mucho más asequible y generalizada y los resultados que obtiene apenas difieren de los obtenidos con el *dye-test* (Joss, 1992), por lo que también se ha utilizado como método de referencia (Olsen y Root, 1994; Elsaid y col., 1995; Obwaller y col., 1995). Esta prueba también se ha aplicado para la detección de IgM e IgA, aunque con la desventaja de presentar falsos positivos por la presencia de factor reumatoide o anticuerpos antinucleares (Oxelius, 1972) y falsos negativos como consecuencia de efectos inhibitorios originados por altos niveles de IgG (Filice y col., 1980; Pyndiah y col., 1979). El fluoroinmunoanálisis (FIA) es un método en el que se utilizan marcadores fluorescentes; en el mercado existe el sistema automatizado (FIAX-STIQ) en el que la lectura de la reacción se realiza mediante un fluorímetro. Es utilizada como técnica de cribado, pudiendo realizar al mismo tiempo el estudio de otros antígenos (rubeola, citomegalovirus, varicela-zoster), aunque con limitaciones en sus resultados (Gordon y col., 1981).

Otras técnicas empleadas para la detección de IgG son las de aglutinación. La aglutinación directa es una técnica sencilla que utiliza taquizoítos fijados con formaldehído, puede presentar falsos positivos con la presencia de IgM inespecíficas en el suero, por lo que se realiza una variante que es la aglutinación directa sensibilizada, en la que previamente se eliminan las IgM con un tratamiento con 2-mercaptoetanol

(Desmonts y Remington, 1980). La hemaglutinación indirecta ya no se utiliza por detectar los anticuerpos después y durante más tiempo que las otras pruebas antes mencionadas. Una prueba de aglutinación interesante es la aglutinación diferencial o DAT (*Modified Direct Agglutination test*) que permite diferenciar la infección reciente. En este método la aglutinación diferencial HS/AC muestra títulos comparativos de IgG dirigidos contra dos antígenos diferentes, en el que el antígeno AC (taquizoítos fijados con acetona o metanol) es específico de la superficie del taquizoíto, reconociendo los anticuerpos producidos al inicio de la infección, que son diferenciados de los dirigidos contra la fracción HS (taquizoítos tratados con formalina), producidos más tardíamente (Danneman y col., 1990; Thulliez, 1998 b).

Las técnicas de enzimoimmunoanálisis (ELISA) son muy utilizadas para la detección de IgG antitoxoplasma. Existen numerosos sistemas de ELISA, algunos de los cuales están comercializados y otros han sido puestos a punto en diversos laboratorios, por lo que es difícil establecer comparación entre los resultados obtenidos. Las principales variaciones se basan en el antígeno utilizado y la enzima conjugada en el método de detección. En la mayoría de las pruebas, tanto propias de los laboratorios como comerciales, el antígeno utilizado es un antígeno poco purificado obtenido de la lisis de taquizoítos de la cepa RH (Olsen y Root, 1994; Obwaller y col., 1995; Liesenfeld y col., 1996). Otro tipo de antígeno empleado es el compuesto por taquizoítos completos, obtenidos a partir de cultivos celulares libres de suero, adsorbidos a la placa (Obwaller y col., 1995). Actualmente se están utilizando antígenos recombinantes como los H4/GST y H11/GST, con buenos resultados de especificidad y sensibilidad (Tenter y Jhonson, 1991). Las enzimas más empleadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, sin diferencias apreciables entre ellas (Tijssen, 1985).

Se han comparado los resultados obtenidos con la prueba de ELISA e IFI, observando resultados discrepantes en algunos trabajos (Woodward, 1982; Violand y col., 1982) y concordancia en otros (Lin y col., 1980; Van Loon y Van Der Veen, 1980). Esto se considera debido al antígeno empleado, pues en la IFI se usa de membrana mientras que en el ELISA es de membrana y citoplásmicos, por lo que se encuentran resultados concordantes cuando se emplea el mismo antígeno (Verhofstede y col., 1987).

Los estudios comparativos entre los diferentes sistemas de ELISA para la detección de IgG presentan resultados equivalentes, por lo que pueden ser adaptados en los laboratorios clínicos como técnica de cribado (Hofgartner y col., 1997; Bacigalupo y col., 1996; Liesenfeld y col., 1996; Olsen y Root, 1994).

Una técnica que está siendo considerada de gran interés para la determinación de la fase de infección en la que se encuentra el paciente, es la determinación de la avidéz de IgG. La afinidad funcional o avidéz es la fuerza de enlace entre los puntos de unión del anticuerpo y el antígeno. La técnica consiste en desestabilizar el enlace de hidrógeno entre el antígeno y el anticuerpo, consiguiendo que los anticuerpos de baja avidéz se disocien del antígeno cuando los anticuerpos de alta avidéz permanecen todavía unidos. Se ha demostrado que la fuerza de unión entre el anticuerpo y los epitopes del antígeno incrementan a lo largo de la infección, determinando que los anticuerpos de baja avidéz se originan en un estadio temprano de infección y los de alta avidéz en una fase posterior (Lew, 1984; Pullen y col, 1986; Ross y col., 1988). Esta técnica ha sido aplicada en el diagnóstico de diversas enfermedades como rubeola, hantavirus, citomegalovirus, herpes, varicela, etc (Thomas y Morgan-Capner, 1988; Hedman y col., 1991; Lafarga y col, 1997; Ory y col., 1995). Hedman y col. introdujeron la técnica para la detección de avidéz en *Toxoplasma* utilizando un ELISA cuantitativo, aplicado a una única muestra de suero, usando como eluyente y agente desnaturante la urea (Hedman y col., 1989). Otros autores han confirmado la utilidad de la determinación de la avidéz de IgG en el diagnóstico de la infección reciente (Lappalainen y col., 1993; Holliman y col., 1994; Jenum y col., 1997; Gutierrez y col., 1997). Los estudios seriados han mostrado que los anticuerpos de baja avidéz desaparecen en la mayoría de los casos a los 3-5 meses (Hedman y col., 1989, Joynson y col., 1990).

6.1.2. Detección de anticuerpos IgM

Los anticuerpos IgM aparecen durante la primera semana de la infección elevándose los títulos rápidamente, para alcanzar el máximo alrededor del primer mes. Comienzan a descender al cabo de dos o tres meses y desaparecen en teoría antes de un año (Joss, 1992). No obstante se han publicado numerosos casos en los que se detectan las IgM durante meses e incluso años, (Joss, 1992; Domingo, 1996; Lappalainen y col., 1993; Holliman y col., 1994; Jenum y col., 1997; Gutiérrez y col., 1997, Benítez y col., 1998). Así mismo, en la presencia de IgM hay que considerar la sensibilidad y especificidad de la técnica utilizada, el reconocimiento de IgM inespecíficas o anticuerpos "naturales", y las reacciones cruzadas con factor reumatoide o anticuerpos antinucleares (Holliman y col., 1994; Pinon y col., 1996; Gutierrez y col., 1997; Wilson y col., 1997, Arcavi y col., 1997). Cualquier resultado positivo de IgM conduce a la repetición de nuevas pruebas o

a posibles intervenciones terapéuticas, que pueden incluir el uso de terapia antiprotzoaria potencialmente tóxica en individuos inmunocomprometidos, o a abortos terapéuticos en gestantes, por lo que es necesario seleccionar el sistema de diagnóstico con un buen equilibrio entre sensibilidad y especificidad.

Las pruebas de IFI y ELISA adaptadas a la detección de IgM han sido ampliamente utilizadas, pero los falsos positivos originados por reacciones cruzadas llevaron a desarrollar una prueba de ELISA-IgM Doble *Sandwich* (Naot y col., 1981; Hofgartner y col., 1997). El ELISA de captura es más sensible que los ELISAs convencionales y el IFI. Varía según los métodos usados pero el fundamento se basa en la captura de IgM del suero problema por una antiglobulina anticadena- μ humana absorbida en la placa de microtitulación y seguida de una segunda etapa en la que el antígeno toxoplásmico es añadido, observándose la reacción antígeno-anticuerpo mediante una reacción enzimática (Wilson y col., 1997).

La técnica ISAGA-IgM (*immunosorbent agglutination assay*) combina la técnica de aglutinación asociada a la de doble *sandwich*-IgM. Se fundamenta en la captura de IgM específica en una primera fase, utilizando posteriormente como antígeno taquizoítos fijados con formalina y se observa la aglutinación que tiene lugar en los casos positivos. Esta técnica es muy sensible y específica detectando incluso niveles bajos de IgM, importante para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita (Petithory y col., 1996).

6.1.3. Detección de anticuerpos IgA

Los anticuerpos IgA son considerados marcadores de interés de toxoplasmosis activa pues la cinética de este isotipo es más rápida que la de los anticuerpos IgM y no existen anticuerpos IgA “naturales” que interfieran (Kumolosasi y col., 1996). Se han aplicado diferentes técnicas para su detección, tales como ELISA, ELISA de inmunocaptura, ISAGA, *immunoblot* y *Western blot* (Patel y col., 1993; Partanen y col., 1984; Huskinson y col., 1990), siendo las más utilizadas el ELISA de inmunocaptura y la técnica ISAGA (Decoster y col., 1991; Gutiérrez y col., 1997; Foudrinier y col., 1995; Patel y col., 1993; Pinon y col., 1996; Arcavi y col., 1997). La detección de anticuerpos IgA frente al antígeno SAG1 (P30) ha demostrado ser de interés para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita, pues la detección de IgA a veces es más sensible que la detección de IgM, aunque en determinados casos estos anticuerpos no aparecen,

posiblemente según el grado de madurez del sistema inmune del neonato (Decoster y col., 1991; Patel y col., 1993; Foudrinier y col., 1995). Se han detectado resultados IgA positivos por ELISA e ISAGA en recién nacidos no infectados, pues la sensibilidad de la técnica puede detectar IgA procedente de la madre que atraviese cualquier defecto de la placenta, por lo que hay que confirmar los resultados obtenidos (Decoster y col., 1991; Patel y col., 1993). En cambio, la detección de IgA específica en pacientes con SIDA no es útil, ya que no se han encontrado diferencias significativas entre la frecuencia de detección de IgA entre los pacientes con toxoplasmosis crónica quiescente y aquellos con reactivación secundaria (Stepick-Biek y col., 1990; Patel y col., 1993). La detección de IgA ayuda en el diagnóstico de la toxoplasmosis activa en la mujer embarazada pero, debido a la variación individual en la duración e intensidad de la respuesta inmune, no es un marcador preciso ya que los resultados negativos no excluyen una infección reciente ni los resultados positivos la confirman (Patel y col., 1993; Gutierrez y col., 1997; Jenum y Stray-Pedersen, 1998).

6.1.4. Detección de anticuerpos IgE

Los anticuerpos IgE se han detectado en pacientes con primoinfección; en recién nacidos infectados congénitamente, en niños con coriorretinitis y en pacientes con SIDA, utilizando las técnicas de ELISA *sandwich* e ISAGA (Wong y col., 1993; Pinon y col., 1995).

6.1.5. Diagnóstico por técnicas de inmunoblot

El estudio de la respuesta inmune frente a la infección por *Toxoplasma* por técnicas de inmunoblot puede ayudar a identificar los antígenos que son útiles para el diagnóstico de diferentes estados de infección. La técnica de *Western blotting* requiere la transferencia de proteínas a una membrana y analizar el patrón de antígenos de *Toxoplasma* reconocido por los anticuerpos presentes en el suero problema, revelado por un sistema de detección usando inmunoglobulinas anti-isotipo humano (Potasman y col., 1989; Barker y Holliman, 1992). El problema observado es la disparidad de resultados encontrados por diferentes grupos de investigación, debidos a los diferentes métodos de preparación de antígenos y de realización de las técnicas (diferentes porcentajes de acrilamida de los geles, dificultad en medir el tamaño de las fracciones,

etc.), por lo que la falta de estandarización y la complejidad de interpretación por la presencia de anticuerpos naturales en los sueros no inmunes que reaccionan con los antígenos limitan su utilidad diagnóstica. No obstante se han obtenido resultados coincidentes en los principales antígenos detectados (Moir y col., 1991; Davidson, 1992; Rodríguez y col., 1996).

6.2. DIAGNÓSTICO RADIOLÓGICO.

El diagnóstico por radiología y medicina nuclear es de gran utilidad en los casos de toxoplasmosis encefálica (TE). Las principales técnicas utilizadas son la tomografía axial computerizada (TAC) y la imagen de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta última presenta una mayor sensibilidad en los casos de TE activa (Post y col., 1986). En estos casos se observan normalmente lesiones múltiples (a veces única), hipodensas, que captan el contraste en anillo y con localización en ambos hemisferios cerebrales situadas principalmente en los ganglios basales o en la unión cortico-medular. Estas imágenes no son específicas pero suelen ser bastante características en la mayoría de los casos. Con estas técnicas se mantiene el seguimiento de la terapia antitoxoplásmica en los casos diagnosticados empíricamente, ya que los pacientes suelen responder a la terapia en un plazo menor de dos semanas (Luft y col., 1993; Podzamczar y col., 1997). Este diagnóstico presuntivo debe ser confirmado por otras técnicas más específicas. De forma rutinaria la confirmación se realiza tras una respuesta clínica y radiológica a la terapia antiparasitaria (Barker y Holliman, 1992).

6.3. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DIRECTO

La respuesta inmunológica es muy difícil de interpretar en pacientes inmunocomprometidos, fetos y neonatos, por lo que es necesario la utilización de métodos de detección directa del parásito o componentes parasitarios en diversas muestras de tejidos o fluidos corporales.

El diagnóstico parasitológico directo se basa en diferentes técnicas. Las principales se exponen en la tabla 4.

Tabla 4. Diagnóstico parasitológico directo

<i>DIAGNÓSTICO</i>	<i>TÉCNICA</i>	<i>DETECCIÓN</i>	<i>VALORACIÓN</i>
<i>Histológico</i>	a.-Tinción de Giemsa, hematoxilina-eosina. b-Inmunohistoquímica c-Inmunofluorescencia d-Microscopía electrónica	Trofozoítos y quistes	Rápido pero poco sensible, siendo b y c las técnicas más específicas y sensibles.
<i>Aislamiento</i>	-En cultivos celulares -Inoculación animales de experimentación (ratón)	Efecto citopático (8-30 días). Trofozoitos intra y extra celulares por Giemsa o IFI. A las 4-6 semanas seroconversión y quistes cerebrales.	Rápido (a partir del 3º día post-inoculación hasta 30). Específico. Sensibilidad variable Mayor sensibilidad Lento
<i>Detección del genoma del parásito</i>	-Técnicas de biología molecular: PCR	ADN de <i>Toxoplasma gondii</i>	Sensibilidad similar o mayor que aislamiento en ratón. Específico. Rápido
<i>Detección de antígenos</i>	-ELISA de detección de antígenos	Antígenos parasitarios circulantes en fluidos corporales.	Específico. Sensibilidad variable.

6.3.1. Diagnóstico histológico.

El diagnóstico histológico ayuda a la diferenciación con otras patologías como la enfermedad de Hodgkin's, sarcoidosis y leishmaniasis, pero su valor es limitado,

consiguiéndose con los métodos inmunohistoquímicos un aumento de la sensibilidad (Luft y col., 1984; Sundermann y col., 1997). El diagnóstico histológico de nódulos linfáticos de pacientes inmunocompetentes puede ser de utilidad, pero la utilización de técnicas invasivas como la biopsia cerebral en pacientes inmunocomprometidos es controvertida dado que la sensibilidad y especificidad es variable (Luft y col., 1984, Luft y col. 1988).

6.3.2. Diagnóstico por aislamiento de *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii puede ser aislado de diferentes muestras y biopsias por inoculación intraperitoneal a ratones de experimentación y por inoculación en cultivos celulares. Supone un diagnóstico específico, pero la sensibilidad varía mucho según las condiciones de la muestra, tales como el estado de conservación, carga parasitaria y virulencia de la cepa implicada (James y col., 1996). El aislamiento en ratón se considera la prueba de referencia para la detección de *T.gondii* en muestras clínicas (Holliman, 1994) pero el diagnóstico no se confirma hasta las seis semanas postinoculación, por lo que actualmente se está utilizando el aislamiento en cultivos celulares (Calicó y col., 1990; Tirard y col., 1991; Nogués y col., 1993; Arduino y col., 1993; Asensi y col., 1993; Contini y col., 1995), cuyos resultados son más rápidos que en animales de experimentación, pero en estos últimos se ha observado una mayor sensibilidad (Derouin y col., 1987; Barker y Holliman, 1992; Hitt y Filice, 1992) aunque requieren tiempo y sólo pueden realizarse en laboratorios de referencia dada su complejidad.

6.3.3. Diagnóstico por detección de antígenos de *Toxoplasma gondii*.

La detección de antígenos de *Toxoplasma gondii* es una técnica de interés que está en estudio. La presencia de antígenos circulantes en la sangre periférica y orina se relaciona con la infección activa. Se han realizado estudios en modelos animales, usando técnicas de *dot-immunoblot* (Brooks y col., 1985) y ELISA (Van Knapen y Panggabean, 1977; Ise y col., 1985; Huskinson y col., 1989; Acebes y col., 1994; Goñi 1997), y en pacientes humanos (Van Knapen y col., 1985; Dannemann y col., 1991, Letillois y col., 1995; McHugh y col., 1997); en los que se detectan los antígenos tanto

en sangre como en orina. Su presencia indica infección activa, pero se ha observado que los resultados negativos no la excluyen.

6.3.4. Detección del ADN de *Toxoplasma gondii* por métodos moleculares.

Actualmente se están desarrollando técnicas de biología molecular para la detección del genoma de *T.gondii* en diversas muestras del paciente. Los primeros estudios se basaron en la detección del ADN del parásito, fijado en una membrana de nitrocelulosa o nylon, mediante la hibridación con sondas específicas de ADN o *dot-blot* (Savva, 1989; Angel y col., 1992; Blanco y col., 1992; Angel y col., 1997) con buenos resultados pero con sensibilidad inadecuada cuando el número de parásitos es bajo. El desarrollo de la técnica de amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction* o PCR) es de gran interés por su sensibilidad y especificidad, por lo que es considerada prioritaria por algunos autores (Berrebi y Kobuch, 1994).

La técnica de PCR, diseñada al principio de la década de los 80 y desarrollada en los últimos años, ha tenido un impacto revolucionario siendo aplicada en múltiples líneas de investigación tales como el diagnóstico de diferentes enfermedades genéticas e infecciosas, estudios de oncogénesis y polimorfismos genéticos (asociación a la predisposición de algunas enfermedades, tipificación en los trasplantes de órganos, identificación genética de los individuos, caracterización de especies, etc.), aplicaciones en la secuenciación de ADN y estudios de expresión génica, entre otras nuevas aplicaciones y variaciones de métodos que suponen grandes avances en el conocimiento de la genética, tanto en la medicina como en la biología (Mullis y Faloona, 1987; Saiki y col., 1988; Bell, 1989; White y col., 1989; Chuchana, 1992; Erlich y col., 1991). En el ámbito de las enfermedades parasitarias se ha aplicado al diagnóstico y a estudios epidemiológicos (Wilson, 1991; Smith y Hartskeerl, 1995; Swaminathan y Barrett, 1995; Singh, 1997; Monis y Andrews, 1998; Bruijn, 1998).

Mediante la PCR una región específica de ADN es amplificada enzimáticamente a través de sucesivos ciclos de un proceso en el que varía la temperatura de incubación. Para su realización se requieren unos reactivos básicos que incluyen el ADN molde a amplificar; los oligonucleótidos, denominados iniciadores o cebadores (*primers*), de secuencia complementaria a cada uno de los extremos del segmento de ADN a

amplificar; los deoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y una enzima ADN polimerasa. El proceso de amplificación consta de una serie de ciclos a los que se ve sometida la muestra. Cada ciclo está formado por tres pasos o reacciones: i) desnaturalización del ADN bicatenario de la muestra, en el que se separan las dos hebras complementarias por calentamiento (90-95°C); ii) renaturalización o unión (*annealing*) de los cebadores a las secuencias complementarias del ADN muestra por descenso de la temperatura (entre 37°C y 60°C); iii) polimerización, síntesis o extensión, en el que la temperatura (72°C) permite la actuación de la enzima *Taq polimerasa*, catalizando la adición de los distintos deoxinucleótidos trifosfatos, según la complementariedad con la cadena molde, al extremo 3' del cebador, sintetizando la nueva cadena de ADN en dirección 5' a 3'. En los ciclos siguientes tanto el ADN original como el nuevo fragmento sintetizado sirven como molde, originando un crecimiento exponencial de las copias de ADN.

La detección de los ácidos nucleicos amplificados puede realizarse por varios métodos, siendo el más utilizado la electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación, posterior tinción con bromuro de etidio y visualización con luz ultravioleta. En otros casos el producto de amplificación es analizado con enzimas catalizadoras de reacciones colorimétricas o el ADN es transferido a membranas de nylon o nitrocelulosa (*Shouthern blot* o *dot-blot*), detectándose los productos amplificados por hibridación con sondas específicas marcadas radiactivamente o por quimioluminiscencia (Erich y Greenberg, 1994).

Dado el potencial de la PCR se han desarrollado diferentes variantes de la técnica, entre las que se encuentra la PCR secuencial interna o anidada (*nested*) en la cual se realizan dos amplificaciones consecutivas, la primera de ellas utilizando unos cebadores más extrínsecos a la región de interés que originan un producto primario, seguida de una segunda reacción con el producto de amplificación primario como ADN molde usando unos cebadores que reconocen una secuencia interna dentro del producto de amplificación de la primera, dando lugar a otro producto secundario más corto.

El desarrollo de una técnica de PCR aplicada al diagnóstico requiere el reconocimiento de la secuencia diana a amplificar, elección del protocolo adecuado para el procesamiento de las distintas muestras para la obtención de un ADN diana y la optimización de los diferentes parámetros de la técnica.

La técnica de PCR está siendo ampliamente empleada en los últimos años para el diagnóstico de la toxoplasmosis. Se han utilizado diferentes secuencias de ADN dianas procedentes de distintos genes. Entre ellos se destacan el gen B1, repetido 35 veces en el genoma del parásito y de función desconocida (Burg y col., 1989; Hitt y Filice, 1992; Filice y col., 1993; Khalifa y col., 1994; Blanc-Jouvan y col., 1996; Pelloux y col., 1997; Franzen y col., 1997; Forestier y col., 1998); el gen SAG1, que codifica la principal proteína de superficie (Savva y col., 1990; Savva y col., 1995; James y col., 1996;); el gen TGR1E (Robert y col., 1996; Pelloux y col., 1997; Franzen y col., 1997); una secuencia codificadora del rADN de la subunidad pequeña del ribosoma (Cazenave y col., 1991; Dupon y col., 1995) y una secuencia del rADN repetida 110 veces (Guay y col., 1993). Los resultados obtenidos en distintos estudios muestran una sensibilidad de la técnica PCR mayor que el aislamiento por inoculación en ratones y cultivos celulares (Grover y col., 1990; Hitt y Filice, 1992; Dupoy-Camet y col., 1993; Dupon y col., 1995; James y col., 1996).

Se han realizado pocos estudios de diagnóstico de toxoplasmosis por PCR en individuos inmunocompetentes, pues las pruebas serológicas, histológicas y clínicas pueden ser suficientes para determinar la infección. No obstante en un estudio realizado en 54 pacientes con linfadenitis toxoplásmica se observó un resultado positivo por PCR en el 53 % de las muestras de sangre analizadas y su negativación en un periodo inferior a 13 semanas (Guy y Joyson, 1995). En dos estudios realizados de tejidos ganglionar, fijados con formalina, se tuvieron resultados contradictorios. En el primero se observó que, de siete muestras confirmadas por análisis histológico y ocho con sospecha de infección, fueron positivas por PCR seis y una respectivamente (Tsai y O'Leary, 1993); mientras que en el segundo trabajo sólo se obtuvo amplificación en una de nueve muestras analizadas (Weis y col., 1992). También esta técnica ha sido empleada en el diagnóstico de toxoplasmosis ocular, en muestras de humor acuoso y secciones histológicas, detectando el 20-34% de los casos positivos (Aouizerate y col., 1993; Chan y col., 1994; De Boer y col., 1996). En un estudio con sangre de pacientes con toxoplasmosis activa los resultados fueron negativos, mientras que se obtuvieron positivos en muestras de sangre de enfermos que presentaban reactivación, lo que sugiere que la parasitemia es transitoria durante la infección aguda (Ho-Yen y col., 1992c).

La utilidad de la PCR en el diagnóstico de toxoplasmosis congénita, aplicado en gestantes y en niños, está siendo evaluada actualmente. Grover y col., (1990) la utilizaron en líquido amniótico de nueve gestantes con toxoplasmosis activa probada,

obteniéndose siete casos positivos y sin falsos positivos. Resultados similares se observaron en el estudio de 10 muestras de líquido amniótico de diez fetos con toxoplasmosis, con siete positivos, aunque se dieron falsos positivos en dos muestras control (Dupouy-Camet y col., 1993); en el estudio de 10 casos todos fueron detectados por PCR, sin encontrar falsos positivos (Cazenave y col., 1991). En un estudio comparativo con las técnicas de aislamiento en ratones o cultivos celulares realizado con 339 muestras se diagnosticaron por PCR 37 de los 38 casos probados de toxoplasmosis (97,4%), mientras que el parásito fue aislado en 34 casos (89,5%), por lo que la PCR se presentó como una técnica significativamente más sensible, no observándose falsos positivos gracias a la utilización de medidas específicas para evitar la contaminación (Hohlfeld y col., 1994). Estos autores confirman la utilidad de la técnica en estudios posteriores (Forestier y col., 1998). En otros estudios la sensibilidad encontrada no fue tan alta, reportándose un 59% de detección por PCR y un 41% por inoculación a ratón (Jenum y col., 1998a). Las medidas a tomar para evitar contaminaciones son muy importantes, ya que se ha observado el riesgo de contaminaciones cruzadas en PCR cuando la mayoría de las muestras analizadas son positivas (Joss y Ho-Yen, 1997). En un estudio de niños infectados congénitamente se utilizó la técnica en muestras de orina, observándose por primera vez la posibilidad de utilización de esta muestra en el diagnóstico por PCR de la toxoplasmosis (Fuentes y col., 1996).

Han sido numerosos los estudios realizados en pacientes inmunocomprometidos, sobretudo en enfermos VIH positivos, aunque también se han reportado estudios de pacientes receptores de transplantes (van de Ven y col., 1991; Johnson y col., 1993; Blanc-Jouvan y col., 1996), detectando el ADN de *T.gondii* en muestras de líquido cefalorraquídeo (Caramello y col., 1993; Dupon y col., 1995; Rodríguez y col., 1997; Antinori y col., 1997; Novati y col., 1994); sangre (Dupouy-Camet y col., 1993; Filice y col., 1993; Kalifa y col., 1994; Dupon y col., 1995; Robert y col., 1996; Pelloux y col., 1997; Franzen y col., 1997) y lavado broncoalveolar (Bretagne y col., 1993; Liesenfeld y col., 1994; Bretagne y col., 1995a; Lavrard y col., 1995).

Los estudios realizados en el modelo murino detectaron ADN del parásito en sangre en el 50% de los casos en el día 3 postinfección con la cepa RH y en el 100% a partir del día 4 (Weiss y col., 1991) y a las 16 horas en el 50% de los ratones infectados con cepa RH y 100% a los dos días con cepas RH o Beverley. No se encontraron reacciones cruzadas con otros patógenos oportunistas que pueden ser encontrados en la sangre de

pacientes inmunocomprometidos como son adenovirus, virus herpes, citomegalovirus, *Estafilococcus aureus* y *Candida albicans* (Josy col., 1993).

En el diagnóstico de TE mediante PCR en muestras de sangre se ha observado diferente sensibilidad según los estudios realizados, encontrándose entre el 20- 30% en los estudios con un mayor número de pacientes, y una especificidad del 100% (Dupon y col., 1995; Robert y col., 1996; Franzen y col., 1997; Pelloux y col., 1997). También ha demostrado una mayor sensibilidad que la hallada en el aislamiento en cultivos celulares o animales de experimentación (Dupouy-Camet y col., 1993; Filice y col., 1993; Pelloux y col., 1997). Los resultados obtenidos indican la posibilidad de parasitemias transitorias e intermitentes (Filice y col., 1993). Se considera que la mayoría de los casos de TE resultan de la reactivación local de quistes cerebrales latentes, por lo que la parasitemia no siempre se produce, siendo de mayor utilidad la detección de *T.gondii* en sangre por PCR en casos asociados a una infección cerebral severa, extracerebral o diseminada (Khalifa y col., 1994; Robert y col., 1996), aunque también es interesante en la monitorización de los tratamientos específicos instaurados (Dupouy-Camet y col., 1993). La alta especificidad de la técnica puede ayudar a diferenciar entre la toxoplasmosis cerebral y otras enfermedades cerebrales (Franzen y col., 1997).

La detección por PCR del parásito en líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con SIDA y TE ha sido evaluada presentando una sensibilidad variable, entre el 30-100% según los distintos estudios (Verhofstede y col., 1993; Schoondermark y col., 1993; Novati y col., 1994; Ostergaard y col., 1993; Cingolani y col., 1996; Rodríguez y col., 1997; Antiróni y col., 1997). La mayoría de los autores consideran de gran utilidad esta técnica dada la alta especificidad demostrada aunque otros la consideran con un valor diagnóstico limitado (Eggers y col., 1995). La instauración de la terapia anti-toxoplasma afecta a la sensibilidad de la detección, observándose que la obtención de la muestra antes o a lo largo de la primera semana tras la instauración del tratamiento mejora la sensibilidad del ensayo (Novati y col., 1994; Cingolani y col., 1996; Monforte y col., 1997).

En estudios realizados analizando muestras de sangre y LCR en pacientes, se constata un incremento de la detección de toxoplasmosis activa si se analizan ambos tipos de muestras (Dupon y col., 1995; Foudrinier y col., 1996).

La toxoplasmosis diseminada y pulmonar en pacientes con SIDA exige una mayor atención por el incremento de casos, en muchas ocasiones mal diagnosticados, para lo que la aplicación de la PCR en muestras de lavado broncoalveolar se ha revelado como

una técnica muy útil mejorando el diagnóstico de estas presentaciones (Roth y col., 1992; Bretagne y col., 1993; Liesenfeld y col., 1994; Bretagne y col., 1995); sin embargo en el estudio realizado por Lavrard y col., detectaron *T.gondii* en las mismas muestras que por las técnicas de tinción de Giemsa y aislamiento en cultivos celulares (Lavrard y col., 1995).

7. EPIDEMIOLOGÍA.

Debido a la gran diversidad de hospedadores y a la infección generalmente asintomática, que persiste durante toda la vida; se favorece el mantenimiento del ciclo del parásito y permite su presencia en la mayoría de los países.

La infección por *Toxoplasma* en humanos es una de las parasitosis más frecuentes en todo el mundo, con valores de seroprevalencia situados entre el 90% observado en Tahití o El Salvador (Ashburn, 1992), el 78% en Nigeria (Anadoko y col., 1992), el 77% en Camerún (Nbumbe y Andela., 1992) e India (Singh y Nautiyal, 1991), el 10-13% reportado en Noruega (Jenum y col., 1998) y el 3% en algunas zonas de EEUU (Ashburn, 1992). En países similares al nuestro como Grecia la prevalencia es del 59% (Decalavas y Papetropoulou, 1990).

En la figura 3 se muestra la distribución mundial de la seroprevalencia de la toxoplasmosis (Dupouy-Carmet y col., 1993).

La toxoplasmosis clínica se presenta de manera esporádica con una incidencia baja, aunque se han descrito brotes epidémicos con una fuente común de infección (Benenson y col., 1982; Teutsch y col., 1979; Masur y col., 1978; Sacks y col., 1983; Choi y col., 1997).

En estudios realizados en diversas zonas de España se han observado valores de seroprevalencia variables. En un estudio realizado en Málaga en mujeres embarazadas se obtuvo un 25,7% de seropositividad para *Toxoplasma* (Guerra-García y Fernández-Sampedro, 1995), y en Valladolid un 38,2% en gestantes procedentes del medio urbano y 30,2% del medio rural, no presentando diferencias significativas (Higuero y col., 1991). Así mismo se encontró una seroprevalencia del 49,7% en gestantes de Cantabria (Rodríguez-Feijoo y col., 1994), un 47,8% en el mismo grupo de Lugo (San Miguel y col., 1990) y un 43,2% en el realizado en Córdoba con individuos sanos, principalmente

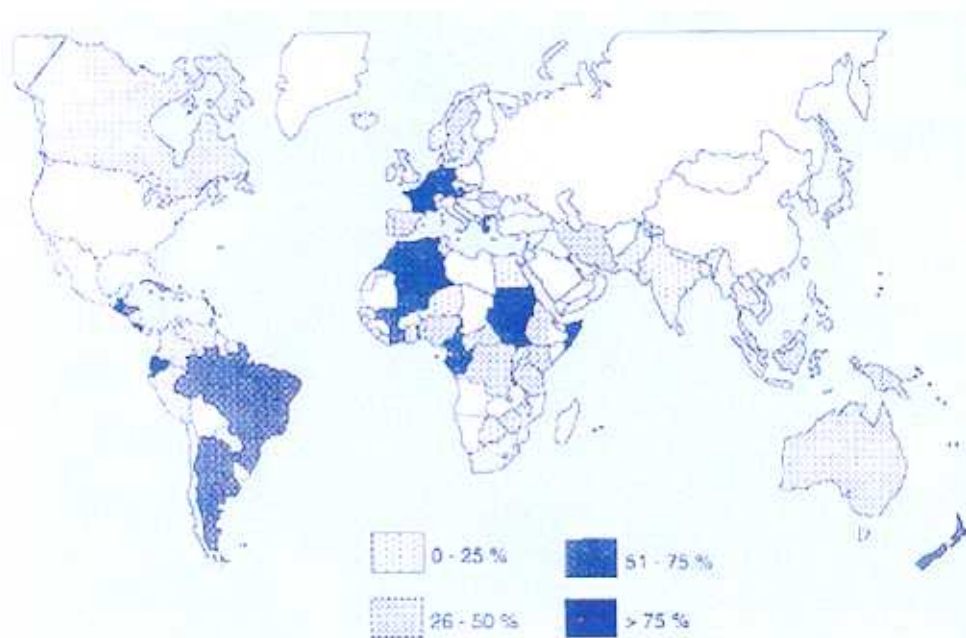


Figura 3. Distribución mundial de la seroprevalencia de la toxoplasmosis (Dupouy-Carmet y col., 1993).

estudiantes (Pérez-Redón y col 1992). En el País Vasco, los valores generales de seroprevalencia hallados fueron del 49% (Pérez-Tallero y col 1987). En el estudio realizado en mujeres de once comunidades autónomas (Madrid, Castilla-León, Castilla-La Mancha, Galicia, Extremadura, Cantabria, Navarra, Baleares, Valencia, Canarias, Andalucía y Ceuta) se observó una seroprevalencia global de 45,7%, no encontrando variaciones significativas entre las mujeres embarazadas y no embarazadas analizadas, pero sí entre los diferentes grupos etarios, pasando del 37% en el grupo de 15-24 años al 62,8% en el grupo de 36-45 años (Domingo, 1996).

La prevalencia de la inmunidad toxoplásmica varía en función de la edad y de las regiones geográficas. Los estudios epidemiológicos realizados en distintas poblaciones demuestran las diferentes fuentes de infección que actúan en la transmisión de la toxoplasmosis (Ruiz y Frenkel, 1980b, Sousa y col. 1988). Estas variaciones pueden deberse a factores culinarios (tipo de carnes consumidas, modo de conservación y de cocinar las carnes), cultural y económicos (hábitos de posesión de animales domésticos como el gato, forma de criar el ganado) o climáticas (temperatura del suelo, humedad). Los diversos factores de riesgo influyen en la prevalencia de la infección en las diferentes zonas geográficas y en los distintos grupos humanos dentro de las mismas áreas geográficas. Así se encontró una seroprevalencia de 71% en gestantes francesas que vivían en París, frente a un 51% de gestantes no francesas habitantes de París y una seroprevalencia del 18% en gestantes autóctonas de Estocolmo frente a un 47% de gestantes inmigrantes habitantes de Estocolmo (Lynfield y Eaton, 1995).

La revisión realizada por Frenkel sobre la seroprevalencia encontrada en varias áreas, revela tres patrones principales de prevalencia según la edad. En el primer patrón los anticuerpos comienzan a aparecer hacia los seis meses de edad, van aumentando constantemente durante 10 a 25 años y llegan a una fase estacionaria o meseta. En el segundo patrón los anticuerpos empiezan a aparecer a los 15 años, aumentando de forma constante hasta los 50-60 años. En el tercer patrón los anticuerpos aparecen pronto en la infancia, para alcanzar una meseta pasados los 35 años. El primer patrón, con la mayor elevación de anticuerpos entre los 6 y los 10-25 años, se encuentra en Centroamérica y Sudamérica tropical y es compatible con la infección por ooquistes en niños y adultos jóvenes, ya que son áreas donde los gatos defecan al aire libre y la alta pluviosidad ayuda a la supervivencia de los ooquistes, mientras que la carne suele cocerse bien. El segundo patrón es común en las zonas del norte y centro de la Europa occidental, en Norteamérica y en el sur de Brasil, siendo compatible con la infección por quistes tisulares que sobreviven en carne cruda mal cocinada; al estar los niños dentro

de las casas se evita la transmisión temprana por ooquistes. El tercer patrón se presenta en Francia, El Salvador y en otros países, siendo compatible con la transmisión de ooquistes en la infancia que puede continuarse durante la vida adulta mediante la ingestión de quistes de carne mal cocida (Frenkel, 1998b).

Ha quedado dicho que en humanos las principales rutas de infección son la oral y la congénita. La infección por vía oral se produce fundamentalmente por ooquistes o quistes tisulares con bradizoítos. La ingestión de carne cruda o poco cocinada en la que están presentes quistes tisulares permite que los quistes sean infectivos por rotura de la pared y liberación de los bradizoítos debido a los jugos gástricos. La exposición al calor (67°C durante 3 minutos), la irradiación con rayos gamma y la congelación a -20°C durante 54 horas, hacen que los quistes no sean infectivos (Dubey y col 1994; Ludén y col. 1992). Sin embargo, la cocción con microondas no asegura la eliminación de la infectividad de los quistes (Ludén y col. 1992; Acebes y col 1994). Es igualmente importante la infección por ooquistes maduros presentes en verduras o productos contaminados (tierra, plantas, suelo, agua) por lo que se destaca el papel primordial de los gatos y la contaminación ambiental que originan (Frenkel, 1995).

Son necesarios estudios epidemiológicos para clarificar la fuente de infección más importante para la transmisión de la toxoplasmosis al hombre en los distintos medios y áreas (Luder y Gross, 1998). Las infecciones inducidas por ooquistes son por lo general más severas que las inducidas por quistes (Choi y col., 1997). Se han descrito casos de brotes de toxoplasmosis originados por la ingestión o inhalación de ooquistes, en los que más del 90% de los adultos involucrados enfermaron (Benenson y col., 1982; Teutsch y col., 1979). Asimismo, se tiene la evidencia epidemiológica que en determinados países, como Francia, la ingestión de quistes de carnes infectadas es la mayor fuente de infección y existen informes de brotes de infección por *T.gondii* relacionados con la ingestión de diversos tipos de carne tales como vaca, cordero (Masur y col., 1978) o venado (Sacks y col., 1983) y de hígado y bazo de cerdo (Choi y col., 1997).

8. CARACTERIZACIÓN DE *Toxoplasma gondii*

Los estudios epidemiológicos y la búsqueda de marcadores de virulencia y resistencias dependen de la presencia de diferentes aislados. La necesidad de diferenciar y

caracterizar poblaciones de parásitos para un mejor diagnóstico, tratamiento y control y la influencia que las variaciones intraespecíficas puede tener en la epidemiología de las enfermedades parasitarias, hacen necesarios los estudio de tipificación. Esta situación ha llevado a desarrollar un gran número de técnicas moleculares que pueden ser usadas para determinar la identidad de los organismos y su comparación. De esta forma los marcadores moleculares han sido utilizados para identificar agentes etiológicos de enfermedades, diagnosticar el estado de la enfermedad y el estudio de patrones de transmisión de enfermedad. Desde los años 80 la aplicación de las técnicas moleculares en la epidemiología de distintas enfermedades ha sido generalizada y ampliamente desarrollada (Monis y Andrews, 1998; Swaminathan y Barret, 1995; Kerr, 1994; Singh, 1997).

Los métodos utilizados para discriminar el género, especie y aislado pueden dividirse en fenotípicos y genotípicos. Los fenotípicos muestran el fenoma bioquímico, fisiológico y biológico, mientras que los genotípicos detectan polimorfismo en ácidos nucleicos o variaciones alélicas al nivel enzimático (Belkum, 1994). La clasificación fenotípica depende del estado de expresión de la célula y puede ser estado-dependiente dentro del ciclo biológico, como se ha observado en los patrones enzimáticos obtenidos en *Trypanosoma cruzi* (Bogliolo y Godfrey, 1987), mientras que el análisis genómico es altamente estable dentro de un organismo a la vez que presenta diversidad entre cepas, incluso entre individuos. La dificultad está en encontrar regiones que sean representativas de esa diferencia y poder realizar el análisis. El desarrollo de la técnica de PCR y de métodos de tipificación basados en la PCR han mostrado nuevos marcadores en estudios epidemiológicos.

La diversidad de aislados de *Toxoplasma* ha sido un problema olvidado durante mucho tiempo, pero desde finales de los años 80 diversos laboratorios están realizando estudios sobre la caracterización de diferentes cepas utilizando técnicas moleculares ya que son morfológica y serológicamente similares (Howe y Sibley, 1994).

El estado inmune del hospedador tiene un papel muy importante en las consecuencias de la infección, no obstante, no puede explicar los diferentes aspectos clínicos observados en pacientes con similar estado inmune. Así, la diferente virulencia en animales mostrada por las distintas cepas de *Toxoplasma*, el hecho de que sólo el 30-50% de los enfermos de SIDA con toxoplasmosis crónica desarrollen encefalitis y que no todas las infecciones agudas maternas produzcan enfermedad en el recién nacido, aunque el riesgo y severidad de enfermedad fetal esté principalmente asociado al

tiempo de gestación, lleva a considerar la idea de que algunos aspectos clínicos de la toxoplasmosis pueden depender, al menos parcialmente, de las diferencias entre los aislados. Asimismo, en los estudios realizados en ratones se ha observado que la respuesta inmune originada por una primoinfección puede no ser suficiente para prevenir la enfermedad, llegando incluso a la muerte en posteriores reinfecciones con otras cepas (Araujo y col., 1997). En consecuencia, todo ello demuestra la importancia de las diferentes cepas en la patogénesis. Por último, es interesante la caracterización de una cepa para los estudios epidemiológicos (brotes, reservorios y fuentes de infección).

Se han considerado diferentes aspectos para la clasificación y tipificación de las cepas de *T.gondii*, tales como la diferente virulencia en ratón, la influencia del aislado en la respuesta inmune del hospedador, el comportamiento en cultivos celulares, la diferenciación antigénica entre aislados y el análisis de marcadores para la caracterización intrínseca (análisis isoenzimáticos y análisis genotípicos); siendo la primera y la última las más utilizadas.

Las cepas de *Toxoplasma* han sido divididas entre virulentas o avirulentas en ratón, considerándose cepas virulentas aquellas en las que la inoculación en ratón de menos de 100 taquizoítos causan una sintomatología aguda que origina su muerte en una semana, y cepas avirulentas aquellas que una inoculación intraperitoneal de 1000 taquizoítos no ocasionan síntomas marcados (Johnson, 1997). Sin embargo, la caracterización de las cepas de *Toxoplasma gondii* según su patogenicidad en ratón no es un método efectivo ya que algunas cepas aisladas originarias de enfermedades agudas en animales y en el hombre son avirulentas en el ratón, y determinadas cepas virulentas en ratón no producen enfermedad en otros hospedadores (Darde y col., 1988; De Champs y col., 1998; Jensen y col., 1998; Costa y col., 1997). Los tratamientos no curativos (Berens y col., 1998), los anticuerpos específicos y las citoquinas (Lyons y Johnson, 1995) y las condiciones de cultivo *in vitro*, ejercen una presión de selección que pueden favorecer la emergencia de un clon dado y un comportamiento como virulento o avirulento en ratón (Frenkel y Ambroise-Thomas, 1997). La diferencia entre la progresión y la severidad de la enfermedad es debida a diferentes variables y factores entre los que se encuentran el estado inmune y hormonal del hospedador; la virulencia y número de organismos de la cepa infectante y la ruta de infección, remarcándose los aspectos genéticos del hospedador y del parásito.

Las diferencias entre las cepas de *T.gondii* fueron indicadas posteriormente por la diversidad antigénica observada con *Western-blots* (Ware y Kasper, 1987; Weiss y col., 1988). Aún más recientemente se han visto las diferencias intrínsecas en diferentes cepas por técnicas moleculares tales como el análisis de los patrones isoenzimáticos y los estudios de ADN con técnicas genotípicas como los patrones de fragmentos de restricción polimórficos (RFLPS) y métodos de tipificación basados en la técnica de PCR.

Caracterización mediante isoenzimas: Los isoenzimas son enzimas que catalizan la misma función pero que tienen diferente estructura tridimensional y por tanto distinta carga eléctrica. Se pueden diferenciar por su distinta movilidad cuando se someten a un campo eléctrico, por lo que pueden ser usados en la caracterización intrínseca de los microorganismos. Las poblaciones de parásitos que poseen los mismos perfiles enzimáticos se denominan zimodemas (Lumsden, 1977; Tibayrenc, 1995). Esta técnica fue inicialmente utilizada para clasificar 7 cepas de *T.gondii*, que presentaron tres patrones o zimodemas, utilizando para ello cuatro sistemas enzimáticos (Aspartato amino transferasa (ASAT), Glutathion reductasa (GR), Fosfo-glucó-isomerasa (PGI) y Malato deshidrogenasa (MDH)) (Dardé y col., 1987; Dardé y col., 1988; Dardé y col., 1988b); no encontrando diferencias en los perfiles isoenzimáticos en las cepas crecidas *in vivo* en ratón y las crecidas *in vitro* en cultivos de fibroblastos humanos (Dardé y col., 1990). Posteriormente, se demostró la presencia de 5 zimodemas en 35 cepas estudiadas, mostrando dos zimodemas (zimodema 1 y 5) una alta virulencia en ratón y tres (zimodemas 2, 3 y 4) una baja virulencia; pero no encontraron una correlación aparente entre los patrones isoenzimáticos y las manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis humana (Dardé y col., 1992).

Caracterización con cariotipos. El material genético de diversos protozoos, entre los que se encuentra *Toxoplasma*, está organizado en cromosomas que al no condensarse en ninguna fase del ciclo mitótico no pueden ser visualizados en el microscopio óptico, lo que impide su análisis citogenético convencional. Este inconveniente se pudo soslayar en los años 80 con el desarrollo de las técnicas de electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Schwartz y Cantor, 1984; Gibson, 1985). Esta técnica hace posible la separación de macromoléculas de ADN, permitiendo el estudio de la estructura y organización cromosómica, pudiendo detectar polimorfismos en tamaño y número de cromosomas entre distintas especies (Dawkins, 1989).

Todos los estadios de *T.gondii*, excepto los macrogametos fecundados (la meiosis se produce en la esporogonia), son haploides (genoma estimado en 8×10^7 pares de bases (pb)) (Cornelissen y col., 1984). El mapa genómico realizado por Sibley y Bothroyd (1992), resuelto por PFGE, muestra un cariotipo de, al menos, diez cromosomas de tamaño entre 2 y mayor de 6 megabases (Mb) derivados del genoma nuclear. *Toxoplasma* contiene también ADN extracromosómico en las organelas y mitocondria (Hehl y col., 1997). No se encontró polimorfismo en el tamaño de los cromosomas entre las diferentes cepas estudiadas debido al gran tamaño de los cromosomas de *Toxoplasma*, no siendo útil para su caracterización (Sibley y Bothroyd, 1992).

Caracterización mediante el análisis del polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción (RFLP). Esta técnica se basa en la utilización de lugares de restricción como marcadores genéticos. El ADN puede cortarse en fragmentos por puntos definidos o lugares de restricción mediante la utilización de endonucleasas de restricción. Éstas reconocen secuencias específicas en la doble cadena de ADN, generalmente de 4 a 6 pb, cortando la molécula siempre que encuentra la secuencia diana. El mapa de restricción es el conjunto de fragmentos de corte de ADN producidos por un enzima (*fingerprinting*). La diferencia en los mapas de restricción de los individuos es lo que se conoce como RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Estos patrones polimórficos o esquizodemas, pueden detectarse directamente en geles de agarosa o poliacrilamida y su posterior tinción o requerir la transferencia a membranas (*Southern blot*) e hibridación con sondas específicas. Los estudios de RFLP han servido para diferenciar especies y cepas de parásitos, conocer sus relaciones filogenéticas aplicando modelos matemáticos de afinidad y estudios de base para el aislamiento de sondas de interés diagnóstico (Gárate y Alvar, 1993; Tibayrenc, 1995). Esta técnica presenta el inconveniente de requerir cantidades relativamente importantes de ADN ($1\mu\text{g}$ a $10\mu\text{g}$) purificado, por lo que es necesario el cultivo o pases en serie en animales, con el riesgo de que vayan sucediendo mutaciones o que se seleccionen clones particulares (Ambroise-Thomas y Okay, 1993).

El RFLP fue el primer método genómico aplicado a la búsqueda de marcadores diferenciales entre las diversas cepas de *Toxoplasma*, utilizando diferentes sondas de ADN genómico y otras específicas y repetitivas secuencias como la TGR1_E y TGR1₆ (Cristina y col., 1991 a y b; Cristina y col., 1995; Parmley y col., 1994; Ambroise-Thomas y Okay, 1993). Estos estudios mostraron la existencia de variación entre especies,

observando que las cepas virulentas presentan una menor variabilidad frente a lo que ocurre en las cepas avirulentas que muestran un genoma más heterogéneo.

Caracterización por amplificación del ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD-PCR). Esta técnica se basa en la amplificación al azar de secuencias de ADN genómico con la utilización de un solo iniciador, de tamaño pequeño (unas 10 bases) y de secuencia seleccionada arbitrariamente. En condiciones de baja astringencia la técnica de PCR genera difentes fragmentos (Williams y col., 1990). El análisis de los productos de amplificación, tras electroforesis en gel, muestra un patrón de bandas específico de cada cepa que funciona como marcador genético. El conjunto de individuos que muestran el mismo perfil o patrón tras la amplificación con el mismo juego de iniciadores se denomina rapdema (Tibayrenc, 1995). En esta técnica no se requiere el conocimiento previo de la secuencia a amplificar, pero el ADN en estudio tiene que estar libre de ADN contaminante (Kerr, 1994; Singh, 1997). Así mismo, la reproducibilidad de los patrones de bandas es muy sensible a las condiciones de la reacción y puede ser afectada por las variaciones de equipos o reactivos entre laboratorios (Monis y Andrews, 1998). Ha sido utilizada en el estudio de variaciones genéticas en diversos parásitos incluyendo *Leishmania* (Andresen y col., 1996); *Cryptosporidium* (Morgan y col., 1995), *Trypanosoma* (Dirie y col., 1993); *Giardia* (Morgan y col., 1993) y *Trichinella* (Rodríguez y col., 1996).

La RAPD-PCR ha sido aplicada para la comparación genómica de *Toxoplasma* con *Neospora caninum* y *Sarcocystis* demostrando un polimorfismo marcado del ADN (Guo y Johnson, 1995a), así como para la caracterización de 11 cepas de *Toxoplasma*, siendo ampliada posteriormente a 35 cepas, encontrando cuatro cebadores capaces de generar un patrón de bandas cuyo análisis filogenético diferencia las cepas en un genotipo relacionado con cepas virulentas a ratón y otro de avirulentas (Guo y Johnson, 1995b; Guo y col., 1997).

Caracterización mediante análisis por reacción en cadena de la polimerasa/ polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Es un método que detecta mínimas variaciones en un gen en el que la sustitución de una base o crea un lugar capaz de ser digerido por una enzima de restricción o anula un lugar de restricción. La técnica PCR es utilizada para amplificar una región de un gen que contiene uno o múltiples lugares de restricción, siendo posteriormente digeridos los productos amplificados por una o varias endonucleasas de restricción. La resolución del producto digerido, visualizado tras electroforesis en gel, define el patrón de bandas que

es usado para determinar un particular tipo alélico, permitiendo la comparación de diferentes aislados (Kerr, 1994; Singh, 1997). Es necesario conocer previamente la secuencia de nucleótidos diana a amplificar, pero tiene la ventaja de no necesitar gran cantidad de ADN, ni que esté demasiado purificado, pudiendo realizarse la técnica con ADN contaminante en material crudo, y permite la detección de múltiples genotipos dentro de la misma muestra (Monis y Andrews, 1998).

Esta técnica fue utilizada en el estudio realizado por Sibley y Boothroyd de 28 cepas procedentes de diversas localizaciones y hospedadores, en el que el análisis del gen SAG1, tras amplificación, digestión con enzimas de restricción, transferencia y la utilización de un fragmento de SAG1 como sonda, mostró un patrón de RFLP en el que se observó la correlación de las 10 cepas virulentas presentando esencialmente el mismo genotipo, mientras que las 18 cepas avirulentas mostraron un mayor polimorfismo, sugiriendo que las cepas virulentas proceden de una línea o linaje que ha permanecido homogénea a pesar de la diversidad geográfica y de la posibilidad de la reproducción sexual (Sibley y Boothroyd, 1992). Estos resultados fueron confirmados en el estudio de 6 cepas virulentas y 3 cepas avirulentas, realizados con esta técnica empleando una *semi-nested* PCR para la amplificación de una secuencia de 315 pb del extremo 3' del gen SAG1, posterior digestión con enzimas y secuenciación, señalando cinco sitios de polimorfismo, tres de los cuales fueron encontrados sólo en las cepas virulentas (Rinder y col., 1995). El estudio posteriormente realizado con 106 cepas procedentes de diversos orígenes, tanto humano como animal, y diversas áreas geográficas, examinó la estructura de la población mediante el análisis por PCR-RFLP de 6 locis independientes (SAG1, SAG2, ROP1, 850, L328 y 62). La comparación filogenética de las cepas permitió agruparlas en tres principales linajes (tipos I-III) (Howe y Sibley, 1995). Se mostró la correlación del tipo I con el zimodema 1, el tipo II con el zimodema 2 combinado con el 4 y el tipo III con el zimodema 3, (Dardé y col., 1992; Cristina y col., 1995). No obstante se encontraron diferencias genéticas entre cepas del mismo linaje, pudiendo obtenerse patrones de RFLP específicos de cepa, no siendo esto incompatible con la estructura de población altamente clonal revelada en el análisis filogenético (Howe y Sibley, 1995). En estudios recientes, con la utilización de la técnica de PCR-RFLP aplicada al gen SAG 2, se ha podido diferenciar las cepas obtenidas de muestras clínicas humanas crecidas en cultivos celulares, observándose en el estudio de 45 cepas procedentes de enfermos de SIDA, 10 de enfermos inmunosuprimidos no VIH+ y 13 de congénitos, la pertenencia del 80% al tipo II, el 10% al tipo I y el 9% al III (Howe y col., 1997). Esto confirma estudios previos en los que se determinaba que las cepas de tipo II son las más asociadas a la toxoplasmosis humana (Dardé y col., 1992;

Howe y Sibley, 1995). El tipo II fue determinado en 36 (83,7%) de las 43 cepas aisladas de cerdos de Iowa, analizadas por PCR-RFLP de los genes SAG1 y SAG2, encontrándose con una frecuencia similar a la hallada en humanos (Mondragón y col., 1998).

Caracterización por otras técnicas basadas en la amplificación genómica por PCR.

La utilización de la técnica de análisis de ARN ribosomal mediante la comparación del análisis por endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR de la menor subunidad ribosomal de ARN (SSU rARN), que presenta regiones altamente conservadas junto con otras diferenciadas entre especies, permitió señalar una marcada diferenciación de *T.gondii* con *Neospora caninum*, *Sarcocystis spp.* y *Plasmodium berghei* y una gran similitud entre las tres diferentes cepas de *T.gondii* estudiadas (Brindley y col., 1993). En posteriores estudios del ARN ribosomal de *Toxoplasma*, la técnica también fue insuficientemente discriminatoria para caracterizar las diferentes cepas (Luton y col., 1995, Homan y col., 1997). Windeck y Gross (1996), comparan los niveles de transcripción del gen SAG1, que es un gen con una sola copia y no contiene intrones (Burg y col., 1988), en el estudio de seis cepas mediante la aplicación de una técnica semicuantitativa de transcripción inversa y amplificación por PCR (RT-PCR), partiendo de ARN de taquizoitos. Se observó que los niveles de expresión del gen SAG1 de las cepas virulentas en ratón fue al menos cuatro veces mayor que en las avirulentas. Dado que SAG1 se considera importante en los procesos de invasión (Grimwood y Smith, 1992; Mineo y col., 1993), revela la posibilidad de una mayor expresión de SAG1 asociada con virulencia (Windeck y Gross; 1996). El estudio, por PCR y posterior secuenciación del producto amplificado, del polimorfismo de microsatélites (definidos como secuencias cortas de dos a seis nucleótidos repetidos en el genoma) del gen de la beta-tubulina de cepas de *T.gondii* procedentes de casos congénitos humanos, no mostró marcadores suficientes para tipificar las cepas avirulentas en ratón (Costa y col., 1997).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Primer objetivo

Aplicación de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de la fase activa de la toxoplasmosis: utilización de la técnica PCR para la detección del ADN de *Toxoplasma gondii* en distintos tipos de muestras, procedentes de los principales grupos de riesgo que presentan características diferentes frente a la enfermedad, con el fin de conseguir un diagnóstico rápido, específico y sensible que pueda determinar la infección.

Segundo objetivo

Determinación de la seroprevalencia e incidencia de la toxoplasmosis gestacional en el área de Madrid y estudio de las variables epidemiológicas implicadas en la prevalencia de la enfermedad, para el conocimiento de la situación actual de la enfermedad en este entorno. Valoración de la técnica de PCR junto con las serológicas y de aislamiento para la determinación de la infección aguda por *Toxoplasma gondii* en los grupos de riesgo de las mujeres embarazadas y recién nacidos, dada la problemática actual que se plantea en estos pacientes.

Tercer objetivo

Utilización de las técnicas de biología molecular para la caracterización genotípica de diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*. Caracterización de cepas autóctonas de origen animal y humano para conocer la prevalencia de los diferentes genotipos del parásito e intentar relacionarlos con las características epidemiológicas y la patología que originan en los hospedadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. PACIENTES

Se analizaron las muestras de pacientes que presentaron algún tipo de sintomatología compatible con toxoplasmosis y de aquellos en los que era necesario descartar la infección por *Toxoplasma gondii*. Estos pacientes se agruparon en los siguientes estratos: **pacientes inmunocompetentes, inmunodeprimidos VIH+, inmunodeprimidos VIH-, mujeres embarazadas y recién nacidos.**

1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

1.2.1. CEPAS DE *Toxoplasma gondii*.

Las cepas de *Toxoplasma gondii* utilizadas en el estudio fueron las especificadas en los apartados siguientes.

1.2.1.1. Cepas de referencia.

- **Cepa RH.** Es una cepa virulenta que provoca la muerte, al cabo de 7-8 días, del 100% de los ratones inoculados por vía intraperitoneal.
- **Cepa C-56.** Es una cepa de virulencia media, cuya inoculación intraperitoneal al ratón de 1000 taquizoitos, produce una toxoplasmosis aguda con una mortalidad aproximada del 60% de los ratones infectados.
- **Cepa Beverly.** Cepa avirulenta que permanece estable y origina una infección crónica asintomática en los ratones.
- **Cepa MC-49.** Cepa avirulenta de características similares a la anterior.

La cepa RH fue cedida por el Prof. D. Antonio R. Martínez (Cátedra de Parasitología de la Facultad de Farmacia, U.C. Madrid). Las cepas C-56, Beverly y Mc-49 fueron cedidas por la Dra. Begoña Díez (Cátedra de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, U. País Vasco, Vitoria).

1.2.1.2. Cepas aisladas en España.

Estas cepas fueron aisladas de muestras procedentes de diversos orígenes.

- **Las cepas Ov-240, Ov-89/96, Ov-241, Ov-74, Ov-80, Ov-86 y Ov-235** proceden de musculatura de oveja de más de cuatro años sin signos aparentes de enfermedad, obtenidas en el matadero de Zaragoza. Se consideran de virulencia baja en su inoculación al ratón.

- **Las cepas Ov-246, Ov-236 y Ov-239** proceden de fetos ovinos abortados, obtenidos en Zaragoza. Se consideran de virulencia baja en ratón.

Las cepas Ov-240, Ov-89/96, Ov-241, Ov-74, Ov-80, Ov-86, Ov-235, Ov-246, Ov-236 y Ov-239 fueron cedidas por el Dr. Juan Antonio Castillo (Cátedra de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, Zaragoza).

- **La cepa 868** procede de cerebro de gato y fue obtenida en Madrid. Se considera de virulencia baja en su inoculación al ratón. Esta cepa fue cedida por la Dra. Mercedes Martínez (Cátedra de Parasitología de la Facultad de Farmacia, U.C. Madrid).

En la tabla 5 se resumen las características de las diversas cepas.

Tabla 5. Cepas de *Toxoplasma gondii*

 AISLADO 	 VIRULENCIA EN RATÓN 	 HOSPEDADOR AISLAMIENTO 	 LOCALIDAD AISLAMIENTO 	 AÑO AISLAMIENTO
RH	Virulenta	Humano	USA	1940
C-56	Virulencia media	Pollo	USA	1961
Beverly	Virulencia baja	Humano	Inglaterra	1959
Mc-49	Virulencia baja	Oveja	USA	1965
Ov-240	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-89	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-241	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-246	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-74	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-236	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-239	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-80	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-86	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
Ov-235	Virulencia baja	Oveja	Aragón	1996
868	Virulencia baja	Gato	Madrid	1992

1.2.2. Animales de experimentación.

Para el aislamiento y mantenimiento de las cepas de *T.gondii* se utilizaron ratones Swiss hembras de 3-4 semanas de edad, con peso aproximado de 25-30 gr, procedentes del animalario de experimentación del Centro Nacional de Microbiología. Se siguieron las normas establecidas en el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

1.2.3. Muestras biológicas analizadas.

En los diferentes experimentos realizados, se procesaron diversos tipos de muestras tanto de origen humano como de ratones de experimentación.

1.2.3.1. Muestras humanas.

Se analizaron muestras de mujeres gestantes, recién nacidos, enfermos inmunodeprimidos y enfermos VIH +, con sospecha de padecer toxoplasmosis activa, de los siguientes tipos: suero, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico (LA), lavado broncoalveolar (LB), biopsia cerebral (BC), líquido pericárdico (LPE), líquido pleural (LPL), placenta, humor acuoso (HA) y ganglio.

1.2.3.2. Muestras procedentes de ratones de experimentación.

Se procesaron muestras de ratones inoculados experimentalmente con las cepas de *Toxoplasma gondii* o con las muestras clínicas obtenidas de enfermos sospechosos de padecer toxoplasmosis, de los siguientes tipos: suero, sangre, cerebro, músculo y líquido ascítico.

Todas las muestras fueron recogidas en envases estériles, adecuadamente identificados, y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento, excepto las muestras parafinadas que se mantuvieron a temperatura ambiente.

2. MÉTODOS.

2.1. MANTENIMIENTO DE CEPAS DE *Toxoplasma gondii* EN RATONES DE EXPERIMENTACIÓN.

2.1.1. Inoculación y mantenimiento de la cepa RH, de virulencia alta.

Dada la virulencia de ésta cepa que ocasiona la muerte de todos los ratones inoculados por vía intraperitoneal sin conseguirse la cronicidad, se procedió al protocolo de mantenimiento siguiente:

10^6 taquizoítos fueron inoculados por vía intraperitoneal a los ratones, a los 3-4 días fueron sacrificados y el líquido ascítico extraído mediante un lavado peritoneal con 5 ml de PBS estéril con 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (Bio Whittaker, Maryland) y 5 U/ml de heparina (Laboratorios Rovi, Madrid). Se procedió al recuento de taquizoítos que fueron utilizados en los experimentos o para inocular a ratones con un nuevo pase de mantenimiento.

2.1.2. Inoculación y mantenimiento de cepas de virulencia media o baja.

El siguiente protocolo se realizó con el resto de las cepas de *T.gondii* utilizadas en el estudio.

El cerebro de ratón crónicamente infectado, incluido en un mililitro de solución salina suplementada con antibióticos, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (Bio Whittaker, Maryland) fue homogeneizado por pases repetidos a través de una jeringuilla. Una vez que el cerebro se encontró suficientemente disgregado, se pasó a través de una aguja de 23 g para romper los quistes y dejar liberados los trofozoitos.

La infección se estableció tras la inoculación del macerado, por vía intraperitoneal, a los ratones, permaneciendo éstos crónicamente infectados.

2.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS

2.2.1. Detección de anticuerpos específicos

El estudio de detección de anticuerpos específicos frente a *T.gondii* se realizó en los sueros humanos y de ratones de experimentación tras la centrifugación de la sangre a 400 g durante 10 minutos. Fueron almacenados a – 20°C hasta su utilización.

2.2.1.1. Detección de Inmunoglobulinas G específicas.

Se realizaron las siguientes técnicas.

2.2.1.1.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El antígeno utilizado fue un liofilizado de taquizoitos de *T.gondii* (Bio Merieux, Marcy-L'Etoile, Francia), resuspendidos en agua destilada y fijados sobre portaobjetos durante 30 minutos a 37°C. Las diluciones seriadas del suero problema fueron dispensadas en los diferentes pocillos del porta, incubando a 37°C durante 30 min. Después de dos lavados con PBS durante 5 minutos y un lavado con agua destilada, se añadió el conjugado (anti-IgG humana o anti-IgG de ratón) marcado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (Bio Merieux, Marcy-L'Etoile, Francia), diluido con una solución al 0.03 % de azul de Evans en PBS. Tras una incubación de 30 min a 37°C en obscuridad, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS también en obscuridad y agitación, y un último lavado con agua. Una vez secados, los portas fueron montados con PBS-glicerol y cubreobjetos. La lectura de las preparaciones se realizó en un microscopio de fluorescencia, estableciéndose como título la última dilución del suero positiva en la que la membrana del parásito aparece claramente fluorescente. Los sueros con título $\geq 1/8$ fueron considerados positivos. Los sueros que presentaron una coloración polar o bipolar, se consideraron negativos.

2.2.1.1.2. ELISA de avidéz de IgG.

Este ensayo valora la avidéz de unión de los anticuerpos IgG al antígeno (afinidad funcional), separando los de baja afinidad producidos en el estado inicial de la infección,

de los de alta afinidad que reflejan una inmunidad establecida. Para ello se realiza un inmunoensayo en el que el antígeno fijado a la microplaca se incuba con diluciones seriadas del suero en duplicado. Posteriormente, una de las diluciones es tratada con un agente desnaturante proteico (urea), que eluye los anticuerpos de baja afinidad unidos al antígeno, mientras que la otra dilución sigue el proceso normal de lavados con una solución tampón. Una vez finalizada la técnica, la proporción entre el total de anticuerpos IgG unidos al antígeno y los anticuerpos residuales tras el tratamiento con la urea, es cuantificada por inmunoensayo.

La avidéz o afinidad de los anticuerpos IgG específicos de *Toxoplasma* fue medida en un inmunoensayo proteico–desnaturante (Hedman y col. 1989). El antígeno utilizado fue obtenido a partir de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) aislados del líquido peritoneal de ratones infectados, filtrado y lavado tres veces con PBS. El sedimento fue resuspendido en agua destilada y sonicado. El lisado fue centrifugado durante 60 minutos a 10.000 g, utilizándose el sobrenadante como antígeno.

El antígeno fue diluido con PBS con urea 8M y usado a concentración de 3 µg proteína /ml para tapizar las microplacas de ELISA (Nunc,Roskilde, Dinamarca). Después del tratamiento con el antígeno durante 20 h a Tª ambiente, las placas fueron lavadas dos veces con tampón-urea, seguido de tres lavados de 10 minutos con PBS con 0.05 % de Tween 20 (PBST) y un lavado con agua. Una vez secadas, se almacenaron a 4 °C.

Los sueros se diluyeron en serie en PBS y fueron aplicados en duplicado a la microplaca. Después de una incubación durante 2h a 37°C, un pocillo de cada doblete fue lavado tres veces durante 5 minutos con PBST, y el otro pocillo con el agente desnaturante urea (6M) diluida en PBST. Se añadió el conjugado anti-IgG marcado con biotina (Biotech,Birmingham, USA) y se incubó durante 1h a 37°C, lavándolo posteriormente con PBST e incubándolo con estreptavidina durante 30 minutos. Se reveló con peroxidasa (Sigma-Aldrich, St.Louis USA) para detener la reacción con SDS al 5%. La absorbancia a 405 nm (A_{405}) fue medida con un lector de ELISA (Titertek Multiskan plus, Cultiel).

Se obtuvieron dos curvas de dilución para cada muestra de suero, una para los anticuerpos anti-*Toxoplasma* lavados con urea (urea⁺) y otra para los lavados sin urea (urea⁻). Una reducción en la concentración de anticuerpos después de tratar con el agente desnaturante, indica presencia de anticuerpos IgG de baja avidéz.

Se obtuvo el coeficiente o índice de avidéz.

$$\text{Índice} = \text{Título (urea}^+) / \text{Título(urea}^-) \times 100$$

Se consideró como resultado (Lappalainen y col,1993): - baja avidéz, índices $\leq 15\%$; valor límite, índices de 16- 25% y alta avidéz para resultados de índices $>25\%$.

2.2.1.2. Detección de inmunoglobulinas M específicas. ELISA de captura anticadena- μ .

Para la detección de IgM específica anti-*Toxoplasma* se utilizó un reactivo comercial (Centocor, Malvern, USA) según el protocolo de la casa proveedora. La técnica es un enzimoimmunoanálisis en el que los anticuerpos anti-IgM humana, cadena μ específica, obtenidos en conejo, son inmovilizados en la superficie de los pocillos de la microplaca. Al añadir el suero, una proporción de las IgM totales es capturada por el anticuerpo. El resto de suero no enlazado se elimina por el proceso de lavado. Posteriormente se incuban con antígeno toxoplásmico y se marcan de forma indirecta con el enzima peroxidasa, con la formación de un complejo entre el antígeno de *Toxoplasma*, el anticuerpo monoclonal de *Toxoplasma* biotinizado y el conjugado de estreptavidina-peroxidasa. El complejo no enlazado se elimina por el lavado, y el complejo que permanece unido al pocillo se identifica por la reacción con el substrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB). Esta es una técnica con elevada sensibilidad y mínimas reacciones de fondo no específicas.

El equipo comercial utilizado se presenta con las placas con los pocillos recubiertos de anti-IgM humana; controles positivo alto, positivo bajo y negativo; el reactivo trazador compuesto por antígeno de *T.gondii* y anticuerpo monoclonal biotinizado, y estreptavidina peroxidasa; junto con el tampón de dilución, diluyente de substrato y el substrato TMB.

Se diluyó el suero al 1/100 en el tampón de dilución y se dispensaron 100 μ l en el pocillo correspondiente de la placa. Se pusieron igualmente los controles y se incubaron durante 1 hora a 37°C, realizándose posteriormente 5 lavados con la solución de lavado. Se dispensaron 100 μ l de reactivo trazador en cada pocillo, incubando 1h a 37°C. Después de 5 lavados, fueron dispensados 100 μ l de substrato diluido, incubando en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue parada

añadiendo 25 µl de ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia a 405 nm (A_{405}) fue medida por un lector de ELISA (Titertek Multiskan plus, Cyttek). El índice de anticuerpos se determinó de la siguiente manera:

Índice= absorbancia muestra / absorbancia control positivo de título bajo.

Se consideró: índice $\geq 1,1$ positivo, índice entre 0,9 y 1,1 dudoso y índice $\leq 0,9$ negativo.

2.2.1.3. Detección de inmunoglobulinas A específicas. ELISA IgA.

Se realizó un inmunoensayo para la detección de anticuerpos específicos de la clase IgA en el que el antígeno soluble está fijado en la placa de microtitulación. Al ponerse en contacto con los anticuerpos específicos del suero, se produce una unión antígeno-anticuerpo que será revelada por la adición posterior del conjugado formado por una inmunoglobulina anti-IgA humana marcada con biotina. Al añadir el sustrato tras los lavados, se produce una reacción de cambio de color si se han formado los inmunocomplejos. La intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos al antígeno, pudiendo cuantificarse en un espectrofotómetro.

El antígeno utilizado fue el mismo que el empleado en la técnica ELISA de avidin, utilizándose el conjugado anti-IgA marcado con biotina (Biotech, Birmingham, USA). La lectura del resultado se efectuó de la misma forma que en el apartado 2.2.1.2.

En todas las técnicas se incluyeron controles negativos, positivos y positivos bajos previamente estandarizados.

2.2.2. Detección de *Toxoplasma gondii* por aislamiento

2.2.2.1. Inoculación y aislamiento en ratón.

Para el aislamiento y diagnóstico de la toxoplasmosis por inoculación en ratón a partir de muestras clínicas, se siguió el método expuesto por Johnson y col. (1993).

Tratamiento de las muestras a inocular

- Fluidos corporales (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, lavado bronquial, líquido amniótico, etc). Estas muestras fueron centrifugadas a 400 g durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, el sedimento resuspendido en solución salina estéril fue inoculado intraperitonealmente al ratón.
- Tejidos. Las muestras de tejidos fueron maceradas en solución salina e inoculados por vía intraperitoneal al ratón.

Ratones inoculados

Los ratones inoculados se mantuvieron en observación para seguir la aparición de síntomas. A los 30 días fueron sacrificados procediéndose a:

- Extracción de sangre por punción cardíaca. Tras la centrifugación de ésta, se tomó el suero en el que se determinó la presencia de anticuerpos específicos anti-*Toxoplasma* de la clase IgG, por las técnicas de IFI y ELISA.
- Extracción del cerebro y emulsión del mismo en solución salina con antibióticos para observar la presencia de quistes. Parte del cerebro emulsionado fue procesado para la realización de la técnica PCR. Otra porción fue conservada para el mantenimiento de la cepa, en el caso de ser positivo, inoculándola de nuevo a ratón (ver apartado 2.1.)
- Examen microscópico del líquido ascítico para la observación de la presencia de quistes y taquizoítos de *Toxoplasma*.

2.2.3. Detección de ADN de *Toxoplasma gondii* por métodos moleculares**2.2.3.1. Procesamiento de las muestras y obtención de ADN.****2.2.3.1.1. Obtención y extracción de ADN genómico de *Toxoplasma gondii*.**

Se obtuvieron trofozoítos de *Toxoplasma gondii*, cepa RH, extraídos de líquido ascítico de ratón al tercer día tras la inoculación intraperitoneal. El líquido ascítico se centrifugó a 1200 g durante 10 minutos, decantándose el sobrenadante. Se añadió PBS estéril y se centrifugó a 50 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue recogido y se volvió a

centrifugar a 1200 g durante 10 min. El sedimento fue lavado otra vez con PBS. Los taquizoítos fueron resuspendidos en PBS y purificados de los restos celulares del hospedador, pasando la suspensión a través de aguja de 27g y filtrándola por membranas de nitrocelulosa de 3 μ m de poro (Nucleopore, Toronto, Canadá). Posteriormente los parásitos fueron concentrados por centrifugación (10 min a 2000 g) y el sedimento congelado a -20°C.

El protocolo seguido para la obtención del ADN fue el descrito por Barker y col. (1986), con algunas modificaciones.

Se descongeló el sedimento para ser lavado tres veces en NET-100 durante 10 minutos a 4°C y 2000 g. A continuación, fueron lisados los taquizoítos a 60°C durante 1 h en un volumen de 0,7 ml de NET-100 y 3 ml de sarcosil 10% en NET-100. Con el fin de eliminar el ARN contaminante, se llevó a cabo una digestión a 37°C, durante 15 minutos, con una solución de ribonucleasa (RNAsa, Sigma) a razón de 1 mg/ml de lisado. Finalizado este tratamiento, se digirió a 37°C durante 2 h con una solución de proteinasa K de 1 mg/ml de lisado. A continuación se añadió 4-amino-salicilato sódico (Analar) 5% p/v y deoxicolato sódico (Analar) 1% p/v, manteniéndolo a temperatura ambiente durante 1 h. Transcurrido este tiempo la muestra se pasó por aguja de 27 g y se depositó en tubos de 25 ml, equilibrando con NET-100. A continuación se realizó una centrifugación de 1 h a 25000 g y 5°C en ultracentrífuga Sorwall (rotor SS-34). Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 500 μ l de TE (10 mM Tris-HCl/ 1mM EDTA, pH 8).

Se realizó la extracción de ADN mediante el método fenol/cloroformo (Sambrook y col, 1989). Para esto se añadió un volumen igual al de la muestra de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se preparó en primer lugar el cloroformo-alcohol isoamílico (proporción 24:1), se añadió a un volumen igual de fenol equilibrado y se agitó. Después de añadir la mezcla sobre la muestra, se agitó durante 1 minuto y se centrifugó 3 minutos a 13000 rpm. Se separaron una fase orgánica, donde se localizan las proteínas, y otra acuosa en la que se encuentran los ácidos nucleicos. Se recogió la fase acuosa y se añadió un volumen igual de cloroformo para eliminar los restos de fenol. Tras agitar durante 2 minutos se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos. La fase acuosa fue recogida y se procedió a la precipitación de los ácidos nucleicos con etanol. Para esto se añadió 1/10 del volumen total de la muestra de acetato sódico 3M (NaAc) y 2,5 del volumen total de etanol absoluto frío. Se agitó y se

dejó precipitar a -20°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó durante 45 minutos en minifuga a 4°C y 12000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el sedimento fue lavado con etanol al 70%, centrifugándolo 5 minutos a 12000 rpm a 4°C . Una vez que el sedimento estuvo seco, se resuspendió el ADN en TE y se mantuvo a 4°C .

Cálculo de la concentración y pureza de ADN.

El método utilizado para estimar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos fue el descrito por Sambrook y col (1989). La concentración de ADN fue determinada por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm, según la fórmula:

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times D \times 50 \mu\text{g/ml}$$

D= factor de dilución

Para calcular la concentración de ADN se midió la densidad óptica (D.O.) de la solución de ADN en TE en un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-120-02) a 260 nm utilizando una cubeta de cuarzo. Como blanco se utilizó TE estéril. Una unidad de D.O. de ADN de doble cadena equivale a 50 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de ADN a valorar se estimó como absorbancia a 260 nm x 10. Con el fin de determinar la pureza de ADN se valoró la D.O. a 280 nm y se calculó la resolución: D.O. 260 nm/ D.O. 280 nm. Si el valor de dicho cociente estuvo comprendido entre 1,8 y 2, se consideró que el ADN era adecuado para su posterior procesamiento.

2.2.3.1.2. Procesamiento de muestras clínicas para detección del ADN de *T.gondii* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .

2.2.3.1.2.1. Procesamiento previo de las muestras.

El tratamiento de las muestras se realizó en una zona específica y controlada para evitar contaminaciones. Con los diferentes tipos de muestras, tanto humanas como de ratones de experimentación, se desarrollaron los siguientes procedimientos:

Las muestras de líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar, líquido pericárdico, líquido pleural y humor acuoso humanos y las muestras de líquido ascítico de ratón, fueron centrifugadas a 1.800 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el sedimento almacenado a -20°C hasta su posterior utilización.

Las muestras de orina se centrifugaron a 1.800 g durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante, realizándose un lavado posterior con PBS y repitiendo la centrifugación antes de congelar a -20°C el sedimento.

Las muestras de sangre fueron procesadas por dos métodos diferentes:

- Conservación de la sangre completa con anticoagulante a 4°C hasta su procesamiento para extracción del ADN con un equipo comercial (Wizard genomic, Promega) como se describe en el apartado siguiente.

- Concentración de células nucleadas mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque según método modificado (Kellog and Kwok, 1990). La muestra de sangre fue diluida en un volumen igual de PBS y posteriormente añadida sobre un volumen de linfoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) igual a 1,5 veces el volumen de sangre, evitando su mezcla. Se centrifugó a 700 g durante 30 minutos. Se recogió con pipeta pasteur la fase del gradiente en la que se encuentran las células nucleadas y posibles taquizoitos (*buffy coat*), y se procedió a su lavado dos veces en PBS a 1800g durante 10 minutos y un tercero con agua destilada estéril para arrastrar los restos de hemoglobina. El sedimento se conservó a -20°C hasta su tratamiento.

Las muestras de biopsia cerebral, remitidas en bloque de parafina y en cortes histológicos, se conservaron a temperatura ambiente hasta la extracción de ADN.

Las muestras de músculo, cerebro, placenta y ganglio se homogeneizaron en PBS con antibióticos y se tomó una porción para el procesamiento posterior, manteniéndose almacenadas a -20°C .

2.2.3.1.2.2. Aislamiento y extracción de ADN de las muestras.

Extracción fenol:cloroformo. Se siguió el método tal y como se expone en el apartado 2.2.3.1.1 (Sambrook y col., 1989).

Extracción con tampón detergente y proteinasa K. Las muestras almacenadas a -20°C fueron descongeladas y resuspendidas en 100 μl de tampón de extracción 10 mM Tris-CIH (pH8,3), 1,5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0,1 mg/ml gelatina, 0,5% Tween 20 y 20 μg proteinasa K (Grob y col.1992) e incubadas 90 minutos a 55°C . Después de inactivar la

proteínasa K a 94°C durante 10 minutos, la suspensión fue centrifugada a 12000 rpm durante 5 minutos, para eliminar los residuos. El sobrenadante que contenía el ADN se recogió y conservó a 4°C hasta el proceso de amplificación.

Extracción cruda por ebullición. Una vez descongelado el sedimento la extracción se realizó tras añadir 100 µl de agua destilada ultrapura estéril a la muestra y calentar a 94°C durante 20 minutos. El sobrenadante se usó directamente en el proceso de amplificación genómica como extracto crudo en el que se encontraba el ADN (Joss y col., 1993).

Extracción con el “Kit Wizard genomic”. En las muestras de sangre completa se procedió al aislamiento y purificación de ADN genómico mediante un equipo comercial “Wizard genomic DNA purification” (Promega, Madison, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este proceso se inicia con el lisado de los glóbulos rojos con una solución que mantiene intactas las células blancas. A continuación éstas son lisadas y las proteínas celulares eliminadas en un paso de precipitación con sales respetando el ADN genómico de alto peso molecular en solución, que es concentrado por precipitación con isopropanol y rehidratado con TE (10 mM Tris-HCl/ 1mM EDTA, pH 8). La muestra así preparada se conserva a 4-8°C y utiliza directamente en el proceso de amplificación.

Extracción de muestras parafinadas. La muestra de **biopsia cerebral**, remitida en bloque de parafina, se trató con el sistema de extracción (Dexat, Promega, Madison, USA) basado en resinas de intercambio iónico y surfactantes, optimizado para la extracción de ADN de tejidos parafinados, según el protocolo de la casa comercial. La muestra así preparada se mantiene a 4°C hasta el proceso de amplificación.

2.2.3.2. Amplificación del ADN de *Toxoplasma gondii* mediante la técnica PCR.

La amplificación *in vitro* del ADN de *Toxoplasma gondii* se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa que permite la realización de numerosas copias del fragmento de ADN diana. Este estudio se llevó a cabo mediante la amplificación de una secuencia del gen B1 del parásito, altamente específico y bien conservado.

2.2.3.2.1. PCR simple.

Se preparó la mezcla de reacción en una zona libre de ADN, manteniendo todas las medidas necesarias para evitar contaminaciones de distinto origen.

La reacción de amplificación fue optimizada variando las condiciones de los diferentes componentes, hasta conseguir las condiciones más adecuadas que exponemos a continuación. El volumen total de reacción para cada muestra fue de 100 μ l. La mezcla de reacción utilizada consistió en 1 mM Tris-HCl (pH8,3) ; 5 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,01% gelatina ; 200 μ M de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ; 0,5 μ M de cada uno de los cebadores T-1 y T-2 y agua destilada ultrapura hasta completar el volumen.

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados.

Denominación	Secuencia	Posición
		Gen B1 <i>T.gondii</i>
T-1	5' GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG	694-714
T-2	5' TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC	887-868

Los cebadores T-1 y T-2 amplifican una zona específica del gen B1 de *Toxoplasma gondii* (Burg y col, 1989) de 194 pb.

Una vez hechas las alícuotas de la premezcla en los tubos eppendorf de 0.2 ml, apropiados para la PCR, se añadieron 2 gotas de aceite mineral. Los tubos se mantuvieron a 4°C en hielo para evitar reacciones inespecíficas. En el área de extracción y procesamiento de muestras, se añadieron 25 μ l de la muestra en estudio, depositándola por debajo del aceite mineral. Los controles fueron dispuestos tal y como se especifica en el anexo I.

Las muestras se amplificaron en un termociclador (Perkin-Elmer, Cetus) sometiénolas a un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, tras el que se incorpora 2,5

UI (0,5 μ l) de Taq DNA polimerasa (Perkin-Elmer, Cetus), continuando con 31 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 1 minuto y 15 segundos a 55°C (renaturalización) y 1 minuto a 72°C (extensión). Se añadió un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Detección del producto de amplificación: Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos y muestras de las técnicas moleculares (productos de PCR, digestiones enzimáticas, etc.) fueron analizados tras electroforesis en gel de agarosa (BIO-RAD) al 2% en tampón TBE 1x en una cubeta de electroforesis horizontal (Minigel, TDI o Maxigel, Hefer). Las muestras de los productos a analizar se mezclaron con un 10 % de tampón de carga y se añadieron al pocillo correspondiente del gel. En una calle del gel se añadió el marcador de peso molecular (ϕ X174 DNA digerido con HaeIII, Sigma). La electroforesis se desarrolló sometiendo las muestras a un campo eléctrico de 70 voltios durante 2 horas. Tras la electroforesis, las muestras fueron teñidas en una solución con EtBr (10 mg/ml), a razón de 100 μ l EtBr/1000 ml de agua destilada, durante 15 min. Los productos así teñidos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una película Polaroid 665.

La presencia de un fragmento de aproximadamente 194 pb tras la PCR simple indicó un resultado positivo a *Toxoplasma*.

2.2.3.2.2. PCR secuencial interna (*nested*)

Esta PCR consta de dos amplificaciones consecutivas, en la segunda de las cuales se utiliza como muestra el producto amplificado de la primera. Una vez optimizada la técnica, el protocolo que se siguió fue el descrito a continuación.

Primera amplificación. El proceso de la primera amplificación fue el señalado en el apartado 2.2.3.2.1, añadiendo 0,2 μ M de los cebadores β -1 y β -2 a la mezcla de reacción. Como control interno de la reacción, para monitorizar la presencia de inhibidores y evitar los falsos negativos, se añadieron los cebadores β -1 y β -2 que amplifican un fragmento de 268 pb del gen de la β -globina humana (Bauer y col. 1991), siendo optimizados para la adaptación al sistema.

Segunda amplificación. El protocolo de la segunda amplificación (interna) es similar al anterior ya que los componentes y concentraciones utilizadas en el tampón de reacción

fueron los mismos excepto los cebadores, utilizándose los oligonucleótidos T-3 y T-4, en lugar de T-1 y T-2, añadiéndolos a una concentración final de 0,5 μ M. Los cebadores T-3 y T-4 tienen su secuencia diana dentro de la región amplificada en la PCR primaria.

Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados

Denominación	Secuencia	Posición
		Gen B1 <i>T.gondii</i>
T-3	5' TGCATAGGTTGCAGTCACTG	757-776
T-4	5' GGCGACCAATCTGCGAATACACC	853-831
Gen β-Globina humana		
β -1	5' CAACTTCATCCACGTTCCACC	-54 a -73
β -2	5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	-195 a -176

Se realizó una segunda amplificación consecutiva a la anterior, utilizando como muestra el producto amplificado de la primera. De esta forma se añadieron 5 μ l del producto de reacción primaria diluido al 1:100 en agua ultrapura. Esta muestra fue añadida en un área específica, diferente de la zona donde se procesaron y se añadieron las muestras en la primera PCR, con todas las medidas adecuadas para evitar contaminaciones (anexo II), pues el producto de amplificación es potencialmente muy peligroso al contener ya la secuencia diana amplificada.

Las muestras fueron sometidas a un proceso de amplificación con un ciclo inicial de desnaturalización de 3 minutos a 94°C, tras el que se añadieron 2,5 UI (0,5 μ l) de Taq DNA polimerasa, continuando con una serie de 25 ciclos de 1 minuto a 93°C, 90 segundos a 55°C y 3 minutos a 72°C. Un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos fue añadido.

Detección del producto de amplificación. Se procedió a la detección de los productos de amplificación tras electroforesis en gel de agarosa al 2%, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 2.2.3.2.1.

La presencia de un fragmento de 194 pb en la primera PCR indicó un resultado positivo a confirmar en la segunda amplificación. La resolución de una banda de 268 pb correspondiente a la zona amplificada del gen de la β -globina humana indicó, en las muestras negativas, que no había presencia de inhibidores de la reacción.

El producto amplificado en la segunda PCR se consideró positivo si aparecía una banda de 97 pb.

2.2.3.3. Detección del ADN de *T.gondii* con sonda específica.

2.2.3.3.1. Transferencia de ADN. Después de la electroforesis y visualización del producto de amplificación de la PCR simple, se procedió a la transferencia del ADN por capilaridad siguiendo el método de Southern (1975) (*Southern-blot*).

El gel se sumergió en 0,25 M HCl durante 10 minutos. Se lavó brevemente con agua destilada y se sometió a un tratamiento de desnaturalización con 0,5 M NaOH /1M NaCl durante 30 minutos y a una posterior neutralización con 0,5 M Tris-HCl /3M NaCl pH 7,4 otros 30 minutos. Los fragmentos de ADN se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon (Hybon-N, Amersham) tratada previamente.

El filtro de nylon, cortado del mismo tamaño que el gel, se dispuso flotando en agua destilada con unas gotas de SDS 10% y a continuación se sumergió en esta solución durante 10 min, saturándose finalmente con 20x SSC (1,5 M ClNa /0,15 M citrato trisódico).

La membrana así tratada se puso en contacto con el gel, forzándose la transmisión del ADN por capilaridad ("*Southern blot*"). Una vez finalizada la transferencia, el filtro se secó a temperatura ambiente y el ADN se fijó a la membrana mediante incubación a 80°C durante 2 h.

2.2.3.3.2. Hibridación con oligosonda

Para confirmar la especificidad del producto de amplificación se realizó la hibridación del *Shouthern-blot* con el oligonucleótido T-3, que presenta la secuencia dentro de la región

amplificada (posición 831-853) del gen B1, (Burg y col 1989). Este cebador fue utilizado como oligosonda marcado en su extremo 5' con $[\gamma\text{-P}^{32}]$ ATP de actividad específica >5000 Ci/mmol (Amersham). En esta técnica el oligonucleótido defosforilado recibe un fosfato en su extremo 5' hidroxil en la forma de P^{32} de ATP marcado en la posición γ . Esta reacción está catalizada por la enzima T4 polinucleótido kinasa (Boehringer). El cebador es sintetizado sin un grupo fosfato en su extremo 5' y así es fácilmente marcado por la transferencia de un $\gamma\text{-P}^{32}$ del $[\gamma\text{-P}^{32}]$ ATP usando la enzima polinucleótido kinasa del bacteriófago T4. Si la reacción es llevada a cabo de forma eficiente, la actividad específica de la sonda puede ser tan alta como la actividad específica del $[\gamma\text{-P}^{32}]$ ATP.

Prehibridación. Se procedió al tratamiento de las membranas o filtros con un tampón de prehibridación (Dupouy-Camet y col., 1993) que contenía 5x solución de Denhardt's (BSA 0,2%, Ficoll 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02%); 6x SSC (1xSSC es 0,15 M NaCl más 0,015 M Citrato sódico); 0,1% SDS (dodecyl sulfato sódico, Bio-Rad) y 50 μg de esperma de salmón por ml, incubando a 65°C durante 3 h.

Marcaje de la oligosonda. Se añadieron a 5 μl de oligonucleótido a concentración 2 μM , los siguientes reactivos en el orden descrito: 10 μl de tampón 10x kinasa (Boehringer), 150 μCi $[\gamma\text{-P}^{32}]$ ATP (Amersham) y 10 unidades de enzima T4 polinucleótido kinasa (Boehringer). La sonda fue incubada a 37°C durante 30 minutos. El P^{32} no incorporado se eliminó pasando el producto de reacción a través de una columna de Sephadex-G50. Se realizó la valoración del marcaje en el contador de centelleo. La actividad específica de la oligosonda utilizada fue alrededor de 2×10^6 cpm.

Hibridación. La oligosonda radiactiva, previamente desnaturalizada (100°C durante 5 minutos), fue añadida a la solución de prehibridación donde se estaban incubando las membranas. Se mantuvo el proceso de hibridación toda la noche a 65°C. Finalizada la hibridación, los filtros fueron lavados a 65°C durante 15 minutos con 2x SSC, 30 minutos con 2xSSC-0,1% SDS y 10 minutos en 1x SSC. A continuación los filtros se secaron a temperatura ambiente y fueron revelados mediante autorradiografía durante 24 h a -70°C con película Kodak Royal X-Omat.

2.3. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Toxoplasma gondii*.

2.3.1. Caracterización genómica de las cepas de *Toxoplasma gondii*

Para determinar el genotipo de las cepas de *Toxoplasma gondii* seguidas en el estudio, se desarrolló una tipificación basada en el polimorfismo del ADN del gen SAG 2. Las muestras fueron analizadas para determinar el gen SAG2 de *T.gondii*, amplificando por separado los extremos 5' y 3' del gen (Howe y col, 1997).

2.3.1.1. Aislamiento del ADN

Se obtuvieron los cerebros de ratones infectados con las diferentes cepas de *T.gondii*, tal como se indica en el apartado 2.1.2. El cerebro fue homogeneizado en 1 ml de PBS. Se recogió una alícuota de 50µl del macerado que fue procesada como se indica en el apartado 2.2.3.1.2.2.

2.3.1.2. Amplificación del extremo 5' del gen SAG2

Para la amplificación del extremo 5' se desarrolló la PCR secuencial interna (*nested*), optimizando las condiciones de reacción a la siguiente pauta.

Primera amplificación. El extremo 5' fue amplificado en un volumen final de reacción de 50µl, compuesto de tampón de reacción 7,5 mM Tris-HCl (pH 9), 5 mM KCl, 2 mM (NH₄)₂SO₄, 0,0001% BSA, 2 mM Cl₂Mg, 200 µM de cada uno de los dNTPs (Pharmacia), 0,5 µM de cada cebador SAG2.F4 y SAG2.R4 y 1,25µl (2,5 u) de enzima Tth (Biotools, Madrid España); siendo cubierto por 2 gotas de aceite mineral.

Se añadieron las muestras de las distintas cepas en la zona adecuada y se pasó al proceso de amplificación en el termociclador. Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de 7 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos consistentes en 94°C durante 45 segundos, 60°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minutos y un ciclo final de extensión de 72°C durante 10 min.

Segunda amplificación. Una vez obtenido el producto de la primera amplificación, se diluyó en agua destilada (1/200) y se procedió a añadirlo como muestra a una mezcla de reacción similar a la anterior, pero con los oligonucleótidos SAG2.F y SAG2.R2 en lugar de los anteriormente indicados.

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados

Denominación	Secuencia
SAG2.F4	5'GCTACCTCGAACAGGAACAC
SAG2.R4	5'GCATCACCAGTCTTCGTTGC
SAG2.F	5'GAAATGCTTCAGGTTGCTGC
SAG2.R2	5'GCAAGAGCGAACTTGAACAC

El proceso de amplificación al que se sometieron las muestras fue de un ciclo de 10 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C y un ciclo final de extensión a 72°C durante 7 minutos.

El producto de amplificación fue visualizado tras electroforesis en gel de agarosa, observándose un fragmento de 241 pb.

2.3.1.3. Amplificación del extremo 3' del gen SAG2.

Para analizar el extremo 3' se procedió de la misma manera que lo expuesto anteriormente para el extremo 5', pero los cebadores fueron distintos.

Primera amplificación. Se utilizaron los cebadores SAG2.F3 y SAG2.R3. La muestra se sometió a los mismos ciclos expuestos anteriormente.

Segunda amplificación o PCR interna. Las muestras obtenidas fueron procesadas de la misma forma que lo expuesto en la PCR interna del extremo 5', utilizando los oligonucleótidos internos SAG2.F2 y SAG.2R

Tabla 9. Secuencias de los cebadores utilizados

Denominación	Secuencia
SAG2.F3	5' TCTGTTCTCCGAAGTGA
SAG2.R3	5'TCAAAGCGTGCATTATCGC
SAG2.F2	5'ATTCTCATGCCTCCGCTTC
SAG2.R	5'AACGTTTCACGAACGCACAC

El producto de amplificación fue visualizado tras electroforesis en gel de agarosa, observándose un fragmento de 221 pb.

2.3.1.4. Análisis del patrón obtenido con enzimas de restricción.

Una vez obtenidos los productos amplificados de los extremos 5'y 3', se analizaron de la siguiente manera.

2.3.1.4.1 Purificación de los productos de la amplificación. Los fragmentos amplificados fueron pasados por columnas de purificación de ADN (Biotools, Madrid, España). Estas columnas son un sistema de purificación, concentración y separación de sales, basadas en una matriz de sílice y diseñadas para recuperar el ADN de diversas soluciones, eliminando los productos contaminantes como enzimas, oligonucleótidos, dNTPs, etc. La matriz de sílice aumenta la unión específica de ADN en presencia de sales caotrópicas. La membrana retiene la matriz durante la elución con las diferentes soluciones durante el proceso, permitiendo la concentración de la muestra. El protocolo seguido fue el descrito por el fabricante, que consistió en añadir 200 µl de Solución I y añadir 10 µl de matriz de sílice y mezclar. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se añadió la mezcla a una columna. Se centrifugó durante 3 minutos a 12000 rpm. Una vez eliminado el eluido, se añadió 300 µl de solución de lavado y se centrifugó durante 3 minutos a 12000 rpm. Se volvieron a repetir los pasos anteriores y finalmente se añadieron 30 µl de agua estéril precalentada a 65°C. Después de una centrifugación de 3 minutos a 12000 rpm se recuperó el eluido con el ADN.

2.3.1.4.2. Digestión con enzimas de restricción. Una vez purificados los productos de amplificación, se procedió a su digestión por las enzimas de restricción.

Digestión del producto de amplificación del extremo 5'. Los productos amplificados del extremo 5' fueron digeridos con la enzima *Sau3AI* (Amersham). Las muestras fueron incubadas junto con cinco unidades de enzima y el tampón de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 100 mM NaCl) en baño a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos de restricción resultantes fueron analizados tras electroforesis en gel de agarosa al 1,2% usando como marcador el *100 bp DNA ladder* (GibcoBRL).

Digestión del producto de amplificación del extremo 3'. Los productos amplificados del extremo 3' fueron digeridos con la enzima *Hha I* (Amersham). Los amplificados fueron incubados junto con cinco unidades de enzima y el tampón de reacción (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 50 mM NaCl) en baño a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos resultantes fueron analizados después de la electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Análisis del genotipo. Con el análisis del patrón de digestión obtenido se pudo determinar la pertenencia o inclusión de cada cepa dentro de cada uno de los tres genotipos establecidos (genotipos I, II y III) de *Toxoplasma gondii*. La digestión del producto amplificado del extremo 5' distinguió el alelo 3 (cepas de genotipo III) de los alelos 1 y 2 (cepas de genotipo I y II). La digestión del producto amplificado del extremo 3' distinguió el alelo 2 (cepas de genotipo II) de los alelos 1 y 3.

2.4. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

Para la valoración de las diferentes técnicas y su aplicación en estudios epidemiológicos, se realizó un estudio en colaboración con los Hospitales "La Paz" y "12 de Octubre" y el Centro de Especialidades de Carabanchel, financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Proyecto de Investigación Coordinado FIS 96/0052, titulado "Estudio de incidencia y valoración de las actuales técnicas diagnósticas en la toxoplasmosis gestacional y congénita"). Desde el mes de enero de 1996 a diciembre de 1997 se realizó un cribado frente a *Toxoplasma*, en las mujeres embarazadas atendidas

en los servicios de ginecología de las instituciones reseñadas. Con los resultados obtenidos se efectuó el estudio siguiente.

2.4.1. Ámbito de estudio. El ámbito de estudio fueron los distritos atendidos por los hospitales "La Paz" del Área 5 de Salud y "12 de Octubre" y Centro de Especialidades de Carabanchel del Área 11, situados en las zonas norte y sur de Madrid.

2.4.2. Sujetos de estudio. Los sujetos de estudio fueron las gestantes controladas en estos centros durante el periodo fijado, que presentaron cualquiera de los criterios de infección primaria por *Toxoplasma* o sospecha, y los recién nacidos de estas mujeres.

Los criterios clásicos de infección primaria seguidos en el estudio:

- Seroconversión de IgG durante el embarazo
- Aumento de 4 o más veces el título de IgG
- Presencia de IgM específica

La participación fue voluntaria y tras la información del contenido del estudio se solicitó la aceptación y consentimiento de la gestante.

2.4.3. Diseño. Los hospitales y centro de especialidades remitieron las muestras de las gestantes y neonatos incluidos en el estudio al C.N.M. siendo procesadas para el análisis serológico, parasitológico y epidemiológico. Junto con las muestras se remitió una encuesta epidemiológica (ver anexo). Se realizó el seguimiento de las gestantes a lo largo del embarazo y de sus recién nacidos durante un año, hasta comprobar su parasitación o la desaparición de anticuerpos maternos residuales. Posteriormente se realizó el procesamiento estadístico de los datos junto con la evaluación del estudio.

2.4.4. Instrumentalización. Los estudios realizados incluyeron pruebas serológicas, de aislamiento y detección de ADN, expuestas en detalle en epígrafes anteriores, junto con el análisis epidemiológico.

2.4.4.1. Estudio serológico. En todos los sueros se realizaron las siguientes pruebas:

- IFI para la titulación de IgG.
- ELISA de avidéz IgG para detectar anticuerpos tempranos de baja afinidad.
- ELISA de captura cadena- μ de IgM.
- ELISA de captura de IgA.

2.4.4.2. Estudio de aislamiento

Se realizó el estudio de aislamiento de *Toxoplasma gondii* en animales de laboratorio a partir de distintas muestras (orina, sangre, líquido amniótico) obtenidas de las gestantes y recién nacidos.

2.4.4.3. Estudio de detección del ADN de *Toxoplasma gondii* y caracterización de cepas.

Se desarrolló el estudio de detección del ADN de *T. gondii* por la técnica de PCR secuencial interna en las diversas muestras obtenidas de las embarazadas y recién nacidos.

En los casos diagnosticados como positivos en la PCR secuencial interna, se caracterizó la cepa involucrada en la infección para determinar su genotipo.

2.4.4.4. Estudio de variables epidemiológicas implicadas en la toxoplasmosis.

Los factores de riesgo asociados a la toxoplasmosis se estudiaron mediante un diseño de casos y controles, recogiendo las variables asociadas al riesgo en la encuesta epidemiológica realizada a las gestantes.

Los casos analizados correspondieron a las mujeres embarazadas seguidas en el estudio que mostraron infección por *Toxoplasma*.

Se seleccionaron como controles mujeres embarazadas que acudieron a la consulta de ginecología en los mismos hospitales y centro de especialidades que las mujeres seleccionadas como casos, elegidas de forma aleatoria. El criterio de selección aplicado fue no presentar anticuerpos específicos frente a *T.gondii* en las pruebas serológicas realizadas durante el embarazo.

Las variables asociadas a riesgos se expusieron en un cuestionario que se realizó por entrevista personal tanto a los casos como a los controles (Ver ficha en el anexo).

El cuestionario recogió información sobre:

- Variables de edad, trimestre de gestación y síntomas presentados.
- Variables relacionadas con los hábitos en la alimentación cárnica: consumo de carne, forma de preparación de la carne, manejo de carne cruda, consumo de hamburguesas y consumo de embutidos.
- Variable relacionada con las medidas higiénicas en el consumo de verduras y frutas.
- Variables relacionadas con los hábitos y contactos con gatos: con gatos propios caseros, con gatos en el entorno.
- Variables relacionadas con los hábitos de contacto con la tierra: jardinería, juegos y trabajo en campo.
- Variable referida al trabajo profesional relacionado con la carne.

2.4.4.5. Análisis de los datos

Los datos obtenidos se analizaron en el programa Epi Info (Versión 6.04). Este es un programa procesador de texto, bases de datos y estadísticas para salud pública producido por Division of Surveillance and Epidemiologic Studies, Epidemiology Program Office, Center for Disease Control, Atlanta y Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. En él se confeccionaron los cuestionarios y se crearon las bases de datos, tanto de valores epidemiológicos como de resultados laboratoriales, del estudio. Posteriormente se procedió al análisis estadístico de los datos.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE *Toxoplasma gondii*

1.1. ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN *IN VITRO* DEL ADN DE *T. gondii*.

1.1.1. Optimización de la reacción de amplificación del ADN por la técnica PCR simple.

El ADN purificado, obtenido de taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*, fue utilizado para la optimización de la técnica de PCR. Se partió de las siguientes condiciones de mezcla de reacción: 10 mM Tris-HCl (ph 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 100 µM de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfatos, 1µM de cada cebador T-1 y T-2, y 2,5 unidades de taq polimerasa. A continuación se fueron realizando diferentes cambios en las concentraciones de MgCl₂, dNTPs, iniciadores, gelatina y enzima.

El MgCl₂ tiene un efecto importante sobre la especificidad y el rendimiento de la reacción por lo que la técnica se realizó con las concentraciones de 1mM, 1,5mM y 2mM, alcanzándose su óptimo a 1,5mM (ver figura 4A).

Los dNTPs fueron probados a concentraciones de 50, 100 y 200 µM, siendo la última la más adecuada.

De las concentraciones de los oligonucleótidos ensayadas (1µM, 0.5µM y 0.2µM) la de 0,5 µM definió el mejor rendimiento (ver figura 4B). Se observó una mejoría en los resultados al incluir en la mezcla de reacción la gelatina al 0,001% (p/v).

Se utilizaron 2,5 unidades de enzima taq polimerasa por considerar que era una concentración suficiente para un volumen de reacción de 100 µl. El incremento a 3 unidades no supuso mejora en el resultado. No obstante, se observó que la eficiencia en la amplificación mejoraba notablemente si se añadía la enzima después del primer ciclo de desnaturalización del ADN.

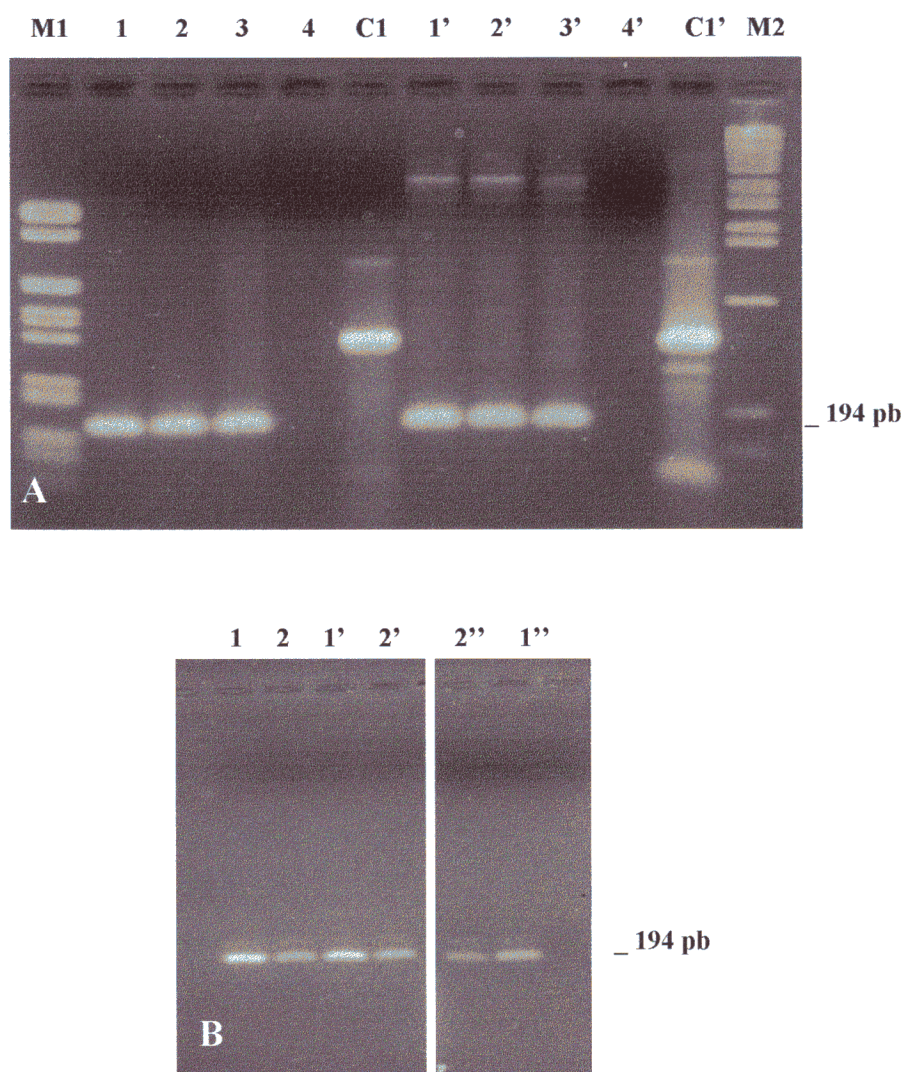


Figura 4. Amplificación del gen B1 de *T.gondii* por el método de PCR simple. Estandarización de las condiciones de amplificación.

(A) Concentración de Magnesio. Calle M1: Marcador Pm2 digerido con *Hae* III (Sigma). Calles 1-3: Productos de amplificación obtenidos a partir de 30, 60 y 120 ng de ADN genómico de *T.gondii* respectivamente, utilizando 1,5mM de $MgCl_2$. Calles 1'-3': Igual que las anteriores usando 2mM de $MgCl_2$. Calles 4 y 4': Controles negativos (sin ADN). Calles C1y C1': Controles positivos de reacción con ADN extraño y cebadores universales.

(B) Concentración de cebadores. Calles 1-2: Productos de amplificación obtenidos a partir de 30 y 15 ng de ADN genómico de *T.gondii* respectivamente, utilizando 1 μ M de cebadores. Calles 1'-2': Igual que las anteriores usando 0,5 μ M de los cebadores. Calles 2''-1'': igual que las anteriores usando 0,2 μ M de los cebadores.

Ciclos de amplificación. De igual forma fueron estandarizados los parámetros de temperatura y tiempo de los ciclos de amplificación a los que se sometieron las muestras, así como el número de ciclos a realizar.

Se partió de un proceso de amplificación de 25 ciclos, cada uno consistente en 1 minuto de desnaturalización a 93°C, seguido de 1 minuto a 55°C y 2 minutos de extensión a 72°C, con un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Los mejores resultados se obtuvieron realizando un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, 31 ciclos consistentes en 1 minuto a 94°C, 1 minuto 15 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C y terminando con un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Tras el proceso de amplificación se obtuvo el producto de PCR de 194 pb esperado.

1.1.1.1. Sensibilidad de la PCR simple

La sensibilidad de la técnica PCR simple se observó tras el procesamiento de diluciones decrecientes del ADN genómico de *T.gondii*, desde 100 ng hasta 1 fg, detectándose hasta 10 pg (ver figura 5 A).

Para analizar la capacidad de la técnica de detectar los taquizoítos de *T.gondii* en presencia de ADN humano, ya que las muestras que deben ser analizadas en el diagnóstico son complejas pues al proceder a la purificación de ADN no sólo se aísla el del parásito sino también el del huésped, se diseñó un segundo experimento. Después de la obtención y purificación de taquizoítos de la cepa RH, se estimó su número por observación microscópica. A continuación se realizaron diluciones seriadas para fijar un número determinado de taquizoítos por muestra. Las muestras fueron procesadas para la extracción de ADN con el método de tampón de extracción y proteinasa K y se les añadió 300 ng de ADN genómico humano a cada una, siendo sometidas posteriormente al proceso de amplificación por PCR. Se detectaron hasta 100 taquizoítos en estas condiciones (ver figura 5 B).

En diferentes pruebas se encontró que la PCR fue inhibida en presencia de un alto número de parásitos ($> 10^5$ taquizoítos) o por exceso de ADN del hospedador ($> 3\mu\text{g}$).

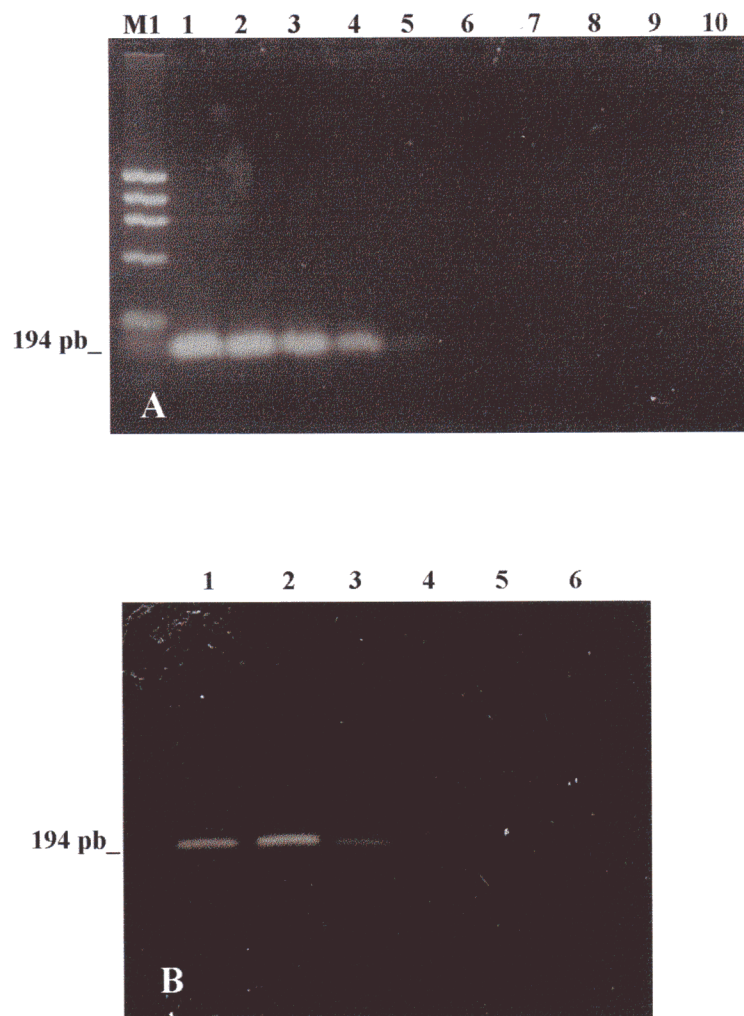


Figura 5. Sensibilidad del método de diagnóstico de *T.gondii* por PCR simple.

(A) Resultado de la amplificación de ADN genómico de *T.gondii*. Calle M1: Marcador $\phi 174$ / *Hae* III. Calles 1-9: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1pg, 100 fg, 10 fg y 1fg respectivamente. Calle 10: Control negativo (sin ADN).

(B) Resultado de amplificación de ADN de taquizoítos en presencia de 300 ng de ADN humano. Calles 1-6: 2500, 500, 100, 20, 4 y 0,75 taquizoítos respectivamente.

1.1.1.2. Especificidad de la PCR simple.

La especificidad fue determinada realizando el proceso de amplificación con distintas preparaciones de ADN genómico humano, de ratón y de otros protozoos y agentes infecciosos.

Se observó la presencia de una banda de aproximadamente el mismo peso molecular que la esperada en la amplificación del ADN de *T.gondii*, en algunas muestras de las que se analizaron con altas concentraciones de ADN humano (> 600 ng), aunque en la mayoría de las muestras esta banda no apareció.

Las muestras de ADN de ratón, de *Leishmania infantum*, *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Pneumocystis carinii* y *Candida albicans* analizadas dieron resultado negativo. En la figura 6 A se observan los resultados obtenidos con diversas muestras.

1.1.2. Hibridación con oligosonda específica de *T.gondii*.

La transferencia de los productos de amplificación obtenidos tras la PCR simple a membranas de nylon y su posterior hibridación con la oligosonda T-3 marcada con P³² demostró ser de gran utilidad para la confirmación de la especificidad del producto amplificado, así como incrementó la sensibilidad en la detección del ADN de *T.gondii*.

1.1.2.1. Sensibilidad de la hibridación.

La sensibilidad para la detección del parásito tras el proceso de PCR simple y posterior transferencia o *Southern-blot* e hibridación con oligosonda se determinó en 1 pg de ADN de *T.gondii* tras autorradiografía durante 48h a -80°C (figura 7 A y B).

Se observó igualmente un incremento notable en la sensibilidad obtenida en muestras clínicas. Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de líquido cefalorraquídeo, sangre y orina de una niña con toxoplasmosis congénita mostraron que en la PCR simple sólo se detectó resultado positivo en la sangre (figura 8 A), mientras que las otras dos muestras resultaron positivas después de la hibridación (figura 8 B).

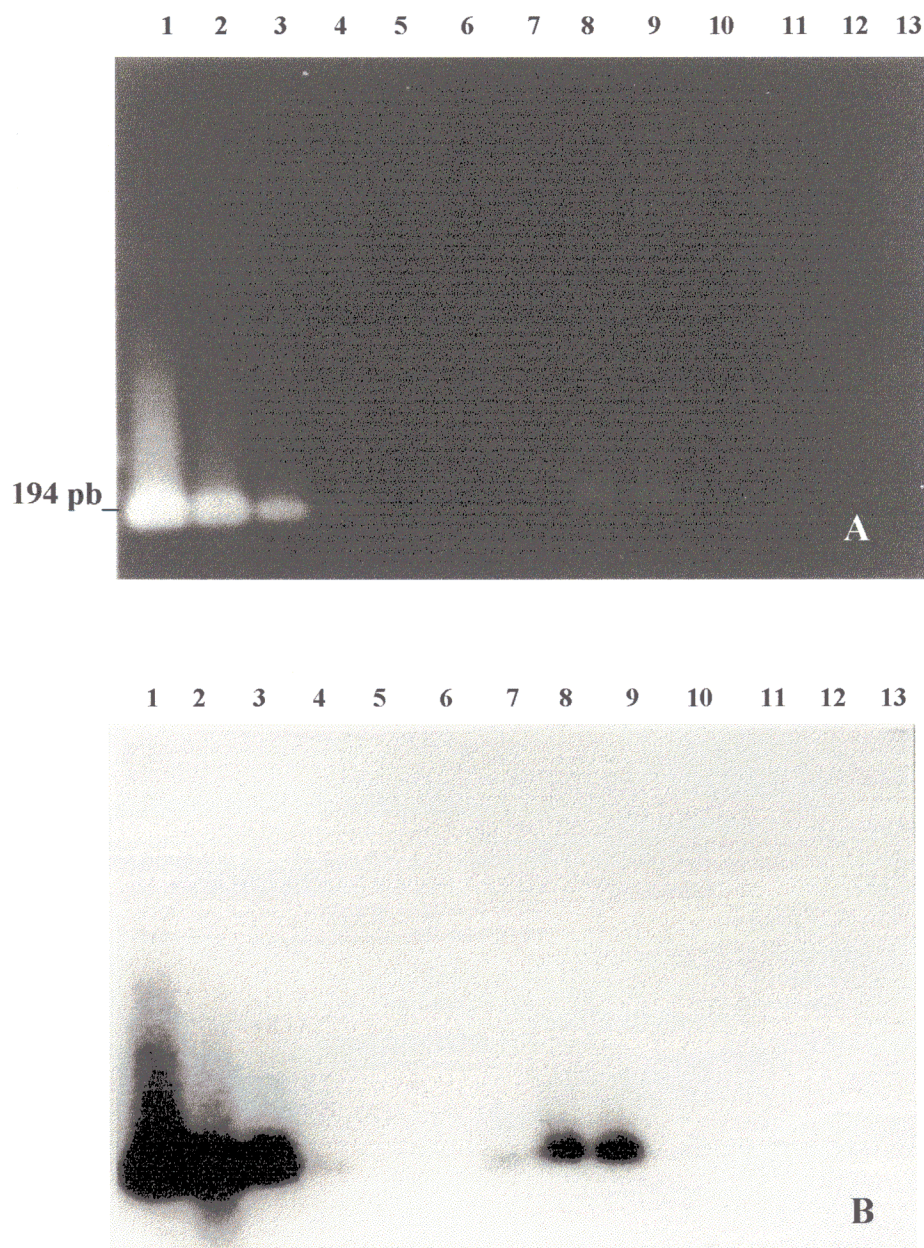


Figura 6. Especificidad del método de diagnóstico de *T.gondii* por PCR simple e hibridación con sonda específica.

(A) Productos de amplificación de la PCR simple de diversas muestras. Calle 1: ADN de *T.gondii* (30 ng). Calle 2: L. peritoneal de ratón inoculado con *T.gondii* (cepa RH). Calle 3: Cerebro de ratón inoculado con *T.gondii* (cepa C56). Calle 4: Corazón de ratón inoculado con *T.gondii* (cepa C56). Calle 5: ADN genómico de ratón (300 ng). Calle 6: ADN genómico humano (300 ng). Calle 7: Orina de paciente con toxoplasmosis. Calle 8: Sangre de paciente con toxoplasmosis. Calle 9: LCR de paciente con toxoplasmosis. Calle 10: ADN de *Leishmania infantum*. Calle 11: ADN de *Trypanosoma brucei*. Calle 12: ADN de *Pneumocystis carinii*. Calle 13: ADN de *Candida albicans*.

(B) Autorradiografía del Southern-blot del gel anterior hibridado con la oligosonda T-3, específica para *T.gondii*.

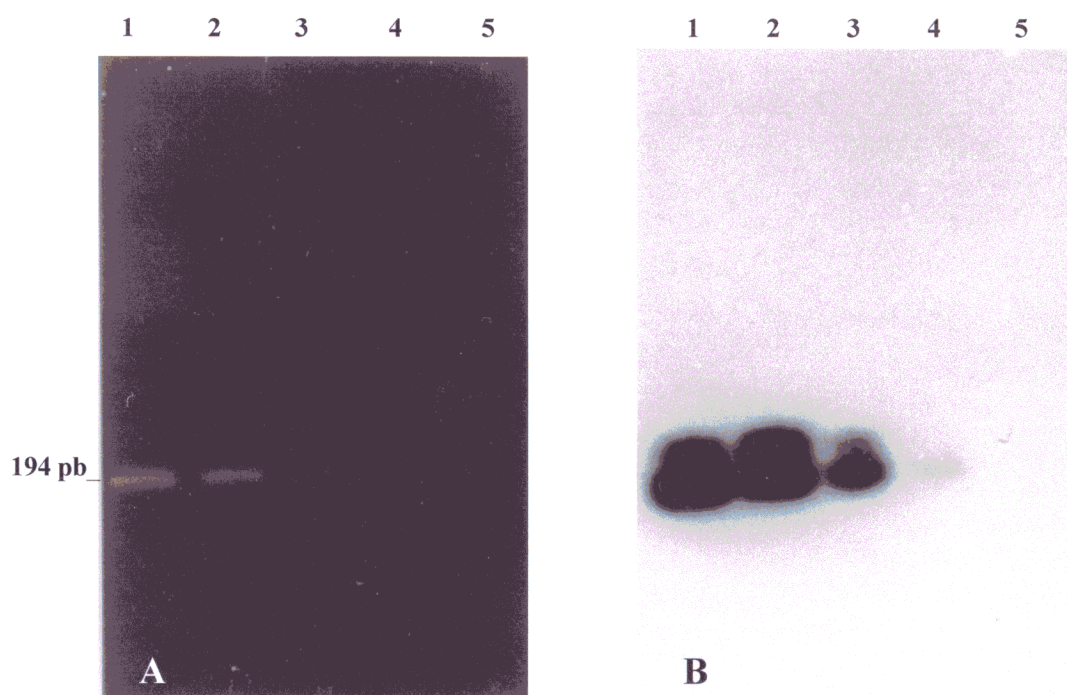


Figura 7. Sensibilidad del método de diagnóstico de *T.gondii* por PCR simple e hibridación con sonda específica.

(A) Resultado de la amplificación de ADN de *T.gondii* por PCR simple. Calles 1-5: 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1pg y 100 fg respectivamente.

(B) Autorradiografía del *Southern-blot* del gel anterior hibridado con la oligosonda T-3, específica para *T.gondii*.

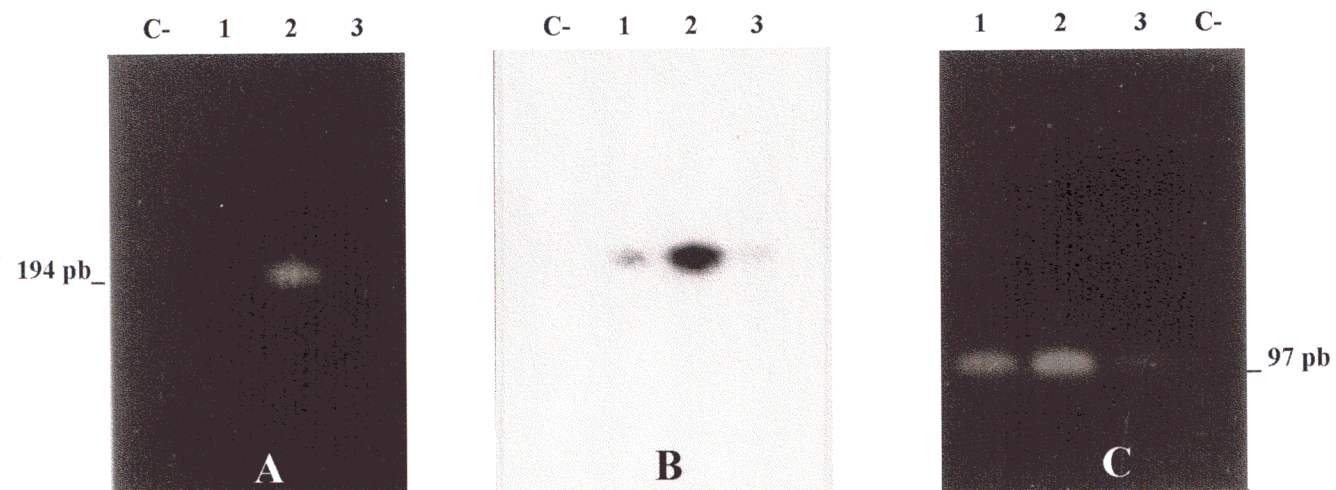


Figura 8. Análisis de muestras de LCR, sangre y orina de un recién nacido con toxoplasmosis congénita.

(A) Amplificación por PCR primaria.. Calles 1: LCR. Calle 2: Sangre. Calle 3: Orina. Calle C-: Control negativo (sin ADN).

(B) *Southern blot* e hibridación con oligosonda T-3 del gel anterior (A).

(C) Amplificación por PCR secuencial interna de las muestras anteriores. Calles 1: LCR. Calle 2: Sangre. Calle 3: Orina.. Calle C-: Control negativo (sin ADN).

1.1.2.2. Especificidad de la hibridación.

La hibridación demostró una gran especificidad ya que todos los controles realizados con la PCR simple, anteriormente expuestos (ver apartado 1.1.1.2), fueron transferidos a membranas e hibridados, dando sólo señal positiva en las muestras que contenían ADN de *T.gondii* (figura 6 B).

Aquellos casos en los que las altas concentraciones de ADN humano mostraron una banda positiva en la PCR que podía inducir a error, se comprobaron como negativos después de la hibridación.

1.1.3. Optimización de la técnica PCR secuencial interna.

La primera amplificación se desarrolló tal como se describe en el apartado 1.1.1. En la segunda, o amplificación interna, se mantuvieron las mismas condiciones de la mezcla de reacción utilizada en la primera, variando sólo los cebadores. En el proceso de amplificación fue necesario estandarizar los parámetros de temperatura y tiempo, así como el número de ciclos empleados para un mejor rendimiento, considerando como el más adecuado el proceso consistente en un ciclo inicial de tres minutos a 93°C, seguido de 25 ciclos de un minuto a 93°C, un minuto 30 segundos a 55°C y tres minutos a 72°C, finalizando con un ciclo de 10 minutos a 72°C.

Se efectuaron diversas pruebas para la selección de la dilución y el volumen de muestra amplificada en la primera PCR para ser añadida a la segunda siendo la dilución 1:100 la más adecuada.

La obtención de un producto de amplificación de 97 pb en la segunda PCR, confirmó un resultado positivo específico.

Control interno. Una vez conseguidas las condiciones óptimas para la amplificación de la secuencia diana del gen B1 de *T.gondii* y probadas en distintos tipos de muestras, se adaptó, en la primera PCR, la utilización de un sistema de cebadores β -1 y β -2 que amplifican el gen de la β -globina. Este procedimiento se utilizó como control interno para la detección de falsos negativos, en el procesamiento de las muestras humanas.

La amplificación del fragmento del gen de la β -globina de 268 pb indicó que la muestra era adecuada, sin presencia de inhibidores inespecíficos que enmascararan la reacción. La coamplificación del control interno y de la secuencia diana de *T.gondii* no supuso variación de las condiciones de la técnica.

1.1.3.1. Sensibilidad de la PCR secuencial interna

La sensibilidad obtenida en la PCR secuencial interna con las distintas concentraciones de ADN genómico de *T.gondii* fue de 100 fg (ver figura 9 A). En el experimento realizado con diversas muestras de número decreciente de taquizoítos de *T.gondii* y 300 ng de ADN genómico humano, se llegó a detectar, entre 1 y 4 taquizoítos (ver figura 9 B).

La realización del proceso de amplificación con el sistema de control interno y sin el control interno, no originó variaciones en los resultados ni en la sensibilidad de la técnica (ver figura 10).

Se detectó igualmente un incremento en la sensibilidad obtenida en el procesamiento de muestras clínicas, confirmando los resultados observados en la hibridación (ver figura 8 C).

1.1.3.2. Especificidad de la PCR secuencial interna

La especificidad de la técnica fue establecida como en las técnicas anteriores. Todos los controles determinaron el resultado esperado, apareciendo positiva la técnica sólo en los casos de muestras con presencia de ADN de *T.gondii*. Aquellas muestras en las que altas concentraciones de ADN humano, sin contener ADN del parásito, originaron una banda de aproximadamente 194 pb en la primera PCR, fueron negativas en la segunda PCR confirmando la especificidad del proceso.

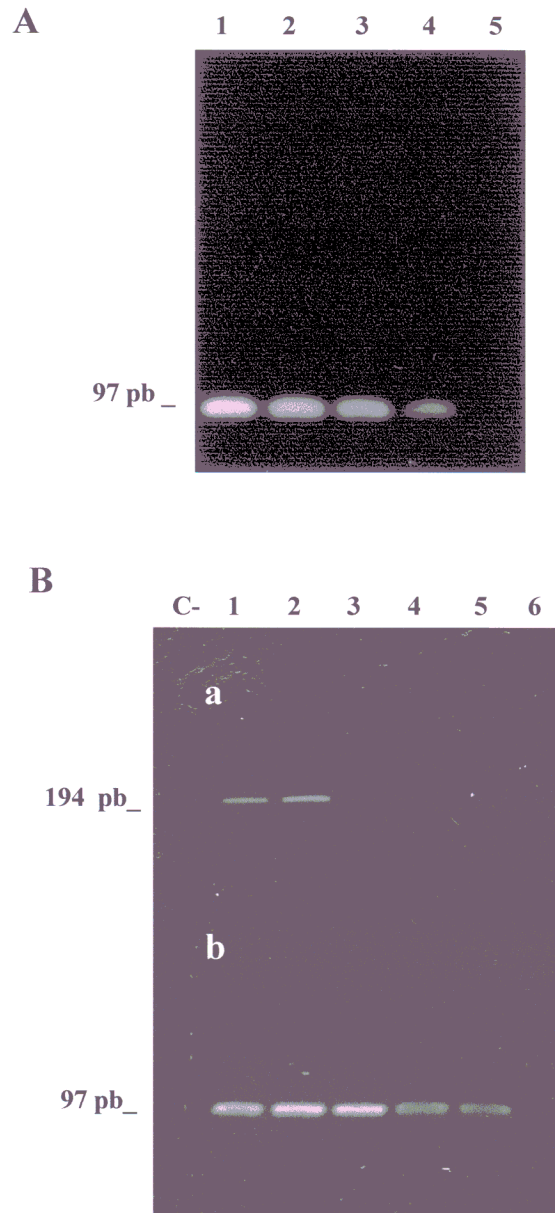


Figura 9. Sensibilidad del método de diagnóstico de *T.gondii* por PCR secuencial interna.

(A) Resultado de la amplificación de la 2^aPCR de ADN genómico de *T.gondii*. Calles 1-5: 100 pg, 10 pg, 1pg, 100 fg y 10 fg respectivamente.

(B) Resultado de la amplificación de ADN de taquizoítos de *T.gondii* en presencia de 300 ng de ADN humano. (a) Productos de amplificación de la 1^a PCR. (b) Productos de amplificación de la 2^a PCR. Calle C-: Control negativo (sin ADN). Calles 1-6: 2500, 500, 100, 20, 4 y 0,75 taquizoítos respectivamente.

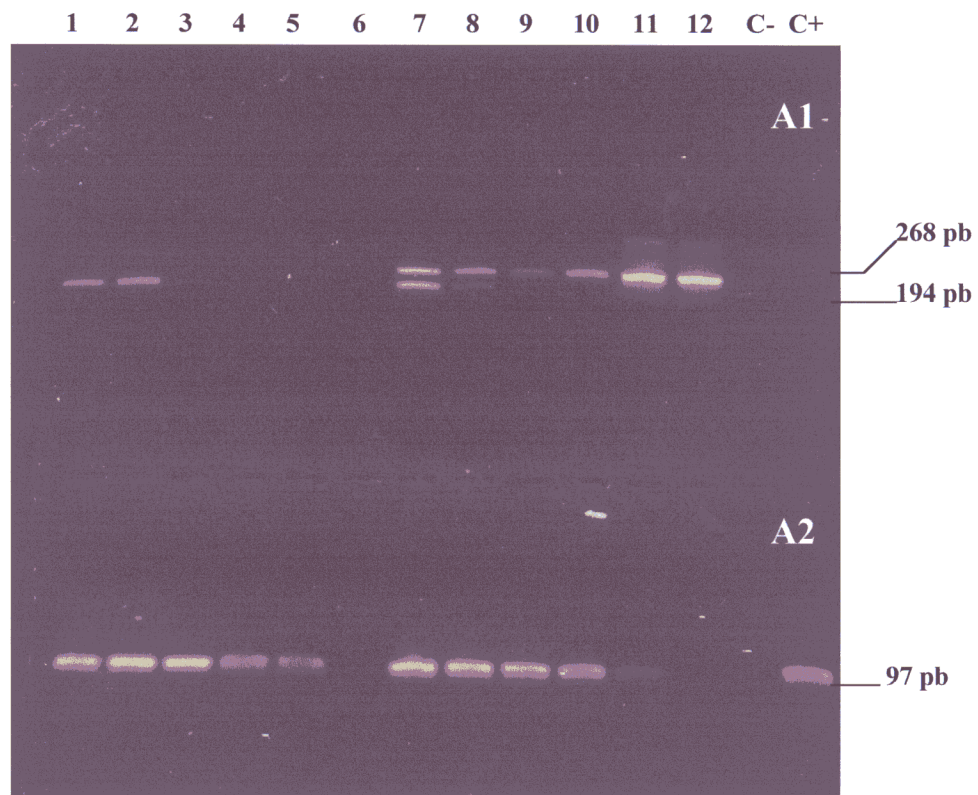


Figura 10. Sensibilidad del método de diagnóstico de *T.gondii* por PCR secuencial interna con y sin control interno. Resultado de la amplificación de ADN de taquizoítos en presencia de 300 ng de ADN humano.

(A1) Productos de amplificación de la 1ª PCR: Control interno de 268pb; *T.gondii* de 194pb.

(A2) Productos de amplificación de la 2ª PCR: *T.gondii* de 97pb.

Calles 1-6: 2.500, 500, 100, 20, 4 y 0,75 taquizoítos respectivamente, sin incluir el control interno. **Calles 7-12:** 2500, 500, 100, 20, 4 y 0,75 taquizoítos respectivamente incluyendo el control interno. **Calle C-:** Control negativo (sin ADN). **Calle C+:** Control positivo (ADN genómico de *T.gondii*) sin ADN humano.

1.2. APLICACIÓN DE LA PCR EN LA DETECCIÓN DEL ADN DE *Toxoplasma gondii* EN MUESTRAS CLÍNICAS.

1.2.1. Determinación de los métodos de procesamiento y extracción de ADN de los diversos tipos de muestras biológicas.

En el estudio se utilizaron distintos tipos de muestras biológicas sobre las que se realizó la técnica de amplificación del ADN de *T.gondii*, por lo que fue necesario determinar que método de extracción de ácidos nucleicos era el más adecuado para cada una.

En las muestras de orina, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, lavado broncoalveolar, líquido pericárdico, humor acuoso y líquido pleural humanas, y líquido ascítico de ratón, el protocolo se inició realizando una concentración de la muestra por centrifugación. En las muestras de órganos y músculos se realizó una homogenización previa para facilitar la extracción. Las muestras de sangre fueron procesadas directamente o después de obtener las células nucleadas por un gradiente de ficoll, según la cantidad y las condiciones de la sangre obtenida.

Para determinar el método a seguir con las diferentes muestras, se compararon los procesos de extracción de ADN cruda por ebullición y la extracción con tampón de lisis con detergentes y proteinasa K. Para ello fueron preparadas las muestras en duplicado conteniendo cantidades decrecientes de taquizoítos de la cepa RH.

Una vez realizada la PCR se observaron mejores resultados y señales más nítidas en las preparaciones tratadas con el tampón de lisis. Los mismos resultados se obtuvieron en especímenes biológicos preparados con taquizoítos y células peritoneales de ratón.

En las muestras clínicas de orina y células sanguíneas de enfermos con toxoplasmosis, procesadas por los dos métodos, se obtuvieron igualmente mejores resultados con la extracción con el tampón de lisis, hallándose en algunos casos muestras positivas con este tratamiento mientras que la alícuota de extracción cruda era negativa.

Dados los resultados se optó por la utilización del método de extracción con tampón de lisis con detergentes y proteinasa K en las muestras clínicas anteriormente mencionadas incluida la extracción de células sanguíneas nucleadas obtenidas tras el gradiente de ficoll.

En cambio, no se consiguieron buenos resultados por ninguno de los dos métodos en las muestras conservadas en parafina o formol, por lo que se optó por la utilización del sistema específico para este tipo de muestras de extracción con resinas de intercambio iónico (Dexat, Promega).

Tampoco se obtuvieron los resultados esperados con ninguno de los dos métodos en las muestras de sangre completa, por el exceso de hemoglobina u otros posibles inhibidores del proceso de amplificación, así que estas muestras fueron tratadas por un método de extracción específica (Wizad genomic, Promega).

1.2.2 Estudio de detección de ADN de diversas cepas de *T.gondii* por PCR en diferentes tipos de muestras de ratones parasitados.

La capacidad de la PCR interna de amplificar la secuencia diana del gen B1 en diferentes cepas de *T.gondii* fue observada procesando muestras de cerebro de ratones inoculados con las cepas de referencia Beverly, C-56 y Mc-49 y las cepas autóctonas Ov-240, Ov89, Ov-241, Ov-246, Ov-74, Ov-236, OV-239, Ov-80, Ov-86, Ov-235 y 868. Todas las cepas fueron amplificadas.

Para determinar la utilidad de la PCR en diversos tipos de muestras biológicas, se realizó el proceso de amplificación a partir de ratones inoculados con la cepa RH y con la cepa C-56. Las muestras investigadas fueron sangre, líquido ascítico, músculo, cerebro y corazón.

Con la PCR simple sólo se detectó el ADN del parásito en algunas muestras de cerebro y de líquido ascítico, pero se obtuvieron resultados positivos en todos los tipos de muestras parasitadas analizadas después del procesamiento con la PCR interna, siendo confirmados por *Southern-blot* e hibridación con la oligosonda específica.

Para evitar las inhibiciones por el exceso de ADN en algunas muestras, se realizaron diluciones de las mismas y se incluyeron en menor volumen en la primera PCR, mejorándose de esta forma el resultado. Las muestras de corazón en muchos casos presentaron inhibiciones reiteradas, por la presencia de inhibidores inespecíficos que no pudieron ser eliminados tras reextracción del ADN con fenol-cloroformo.

La sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR en ratones infectados fue observada inoculando ratones con cepas de referencia (Beverly, C-56 y Mc-49) y cepas autóctonas (Ov-240, Ov89, Ov-241, Ov-246, Ov-74, Ov-236, OV-239, Ov-80, Ov-86, Ov-235 y 868). Cuatro semanas después de la inoculación los ratones fueron sacrificados obteniéndose muestras de suero y de cerebro, siendo estudiados un total de dieciséis ratones. Se procedió de la misma forma con seis ratones control no inoculados con *Toxoplasma*.

Los dieciséis sueros de ratones inoculados con las distintas cepas presentaron títulos positivos por las técnicas de IFI y ELISA y fueron negativos los seis sueros de los ratones control.

En las muestras de cerebro procesadas por PCR interna se observaron quince positivas procedentes de los dieciséis ratones inoculados, y siete resultaron negativas. Esto supuso, tomando como referencia o estándar los resultados serológicos obtenidos, una sensibilidad de la PCR interna del 93% (intervalo de confianza (IC) del 95%, 67.7-99.6) y una especificidad del 100% (IC 95%, 51.7-100), con un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 85%.

1.2.3 Detección de ADN de *T.gondii* por PCR en muestras clínicas para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana.

En este estudio se analizaron un total de 636 muestras procedentes de pacientes que presentaban algún tipo de sintomatología compatible con toxoplasmosis, aunque ésta no fuera la principal sospecha clínica, y de gestantes y neonatos en los que era necesario descartar la infección por este parásito.

Del total de muestras analizadas, el 28.4% (181 muestras) fueron tomadas de pacientes inmunodeprimidos VIH positivos, el 4.4% (28 muestras) de pacientes inmunodeprimidos VIH negativos, el 5% (32 muestras) de pacientes inmunocompetentes, el 37% (235 muestras) de mujeres embarazadas y el 25.2% (161 muestras) de recién nacidos.

Se analizaron diversos tipos de muestras por PCR secuencial interna. Algunas muestras presentaron reiteradamente inhibición de la amplificación no pudiéndose determinar el resultado. Éstas no fueron sometidas a procesos de reextracción del ADN para evitar una posible contaminación en las sucesivas manipulaciones.

Todo el material fue analizado en duplicado, considerándose el resultado como positivo cuando se observó la amplificación en, al menos, dos alícuotas.

Del total de muestras analizadas, el 83% fue negativo (530/636), y el 9% positivo (57/636). El restante 8% no pudo ser determinado por inhibición de la reacción.

En la tabla 10 se presenta el número y tipo de muestras estudiadas así como los resultados obtenidos.

Tabla 10. Resultados de PCR en los distintos tipos de muestras analizadas.

<i>Tipo de muestra</i>	<i>N° muestras</i>		<i>Resultados de PCR</i>					
	<i>Analizadas</i>	<i>%</i>	<i>Negativo %</i>	<i>Positivo %</i>		<i>Inhibición %</i>		
Sangre	184	29%	166	90%	15	8%	3	1,6%
Orina	182	28,6%	161	88%	6	3%	15	8%
Líqu. Cefalorraquídeo	170	26,7%	129	76 %	22	13%	19	1,1%
Lav. Broncoalveolar	26	4%	17	65,4%	6	23,1%	3	11,5%
Líqu. Pleural	1	0,2%	0		1	100%	0	
Líqu. Pericárdico	6	0,9%	5	83,3%	1	16,7%	0	
Líqu. Amniótico	45	7%	38	84%	2	4%	5	11%
Humor acuoso	3	0,3%	2	67%	1	33%	0	
Sangre cordón	4	0,6%	4	100%	0		0	
Placenta	4	0,6%	2	50%	0		2	50%
Biopsia cerebro	8	1,3%	4	50%	2	25%	2	25%
Biopsia pericardio	1	0,2%	0		1	100%	0	
Biopsia ganglio	1	0,2%	1	100%	0		0	
Biopsia muscular	1	0,2%	1	100%	0		0	
Total	636	100%	530	83%	57	9%	49	8%

El análisis de las diferentes muestras estudiadas según el grupo de pacientes se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Muestras estudiadas para diagnóstico de *Toxoplasma gondii*

<i>Grupo de pacientes</i>	<i>Muestra</i>	<i>Nº muestra</i>	<i>Resultados de PCR</i>		
			<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Inhibición</i>
VIH +	Sangre	26	22	4	
	L. ceforraquideo	123	99	10	14
	Orina	12	10	2	
	L. broncoalveolar	8	6	1	1
	Biopsia pericardio	1		1	
	Biopsia cerebro	7	4	2	1
	Humor acuoso	1	1		
	L. pericárdico	2	2		
	Total	180 (100%)	144 (80%)	20 (11,1%)	16 (8,9%)
Inmunodeprimidos VIH-	Sangre	4	3	1	
	L. ceforraquideo	4	2	2	
	Orina	3	3		
	L. broncoalveolar	14	9	4	1
	L. pericárdico	1	1		
	L. pleural	1		1	
	Biopsia cerebro	1			1
	Total	28 (100%)	18 (64,3%)	8 (28,6%)	2 (7,1%)
Inmunocompetentes	Sangre	7	6		1
	Orina	6	3		3
	L. pericárdico	3	3		
	L. ceforraquideo	8	7		1
	L. broncoalveolar	4	2	1	1
	Humor acuoso	2	1	1	
	Biopsia ganglio	1	1		
	Biopsia muscular	1	1		
	Total	32 (100%)	24 (75%)	2 (6,2%)	6 (18,8%)
Embarazadas	Sangre	91	89	1	1
	Orina	91	84		2
	L. amniótico	45	38	2	5
	Placenta	4	2		2
	Sangre cordón	4	4		
	Total	235 (100%)	217 (92%)	3 (1,3%)	15 (6,4%)
Neonatos	Sangre	56	46	9	1
	Orina	70	58	7	5
	L. ceforraquideo	35	21	10	4
	Total	161 (100%)	125 (78%)	26 (16%)	10 (6%)

1.2.3.1. Pacientes inmunodeprimidos VIH positivos.

Se estudiaron 180 muestras pertenecientes a pacientes VIH+. El 72% de las muestras analizadas en este grupo procedió de pacientes que presentaban cuadros clínicos neurológicos compatibles con posible toxoplasmosis cerebral, pero sin excluir la posibilidad de infección por otros agentes etiológicos tales como citomegalovirus, herpes virus y otros virus neurotropos. Los síntomas referidos con más frecuencia fueron cefaleas, convulsiones, pérdida de la conciencia, polineuropatía, leucoencefalopatía, meningitis y encefalitis.

El 4,4% de las muestras procedían de pacientes con afectación pulmonar refiriendo principalmente neumonía intersticial y bronconeumonía, con sospecha de infección por *T.gondii* u otras etiologías posibles tales como *Pneumocystis carinii*, diferentes virus, micobacterias etc.

El restante 23,6% de las muestras fue obtenido de pacientes con diferentes datos clínicos como pericarditis, fiebre y adenopatías entre otros síntomas, que podría entrar dentro de un cuadro de toxoplasmosis generalizada.

De las muestras estudiadas se obtuvieron 20 (11.1%) positivas por PCR, procedentes de 17 pacientes cuyas historias clínicas y resultados de las pruebas diagnósticas se exponen en la tabla 12.

Tabla 12. Enfermos inmunodeprimidos VIH+. Casos positivos a toxoplasmosis por PCR. Datos clínicos.

<i>Caso número</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Datos Clínicos</i>
1	V	25	Pericarditis, fiebre, derrame pericárdico
2	V	SD	Síntomas cerebrales
3	V	33	Encefalitis, neumonía
4	V	SD	Encefalitis
5	M	10	Encefalitis, fiebre.
6	M	9	Fiebre, síntomas gripales persistentes
7	M	SD	Encefalitis, coriorretinitis bilateral
8	V	29	Infartos cerebrales, disfunción biventricular miocarditis
9	M	30	Polirradiculitis, linfoma cerebral
10	M	SD	Encefalitis
11	V	46	Encefalitis, coroiditis, bronconeumonía
12	V	34	Neuritis, parálisis facial
13	M	SD	Encefalitis
14	M	40	Nódulos cerebrales, convulsiones, linfoma no Hodgkin
15	V	SD	Afectación sistema nervioso central
16	V	SD	Fiebre, síntomas cerebrales
17	M	64	Fiebre, síntomas neumónicos

V: varón, M: mujer, SD: sin datos

Se manifestaron síntomas cerebrales y neurológicos en el 82% de los casos estudiados, mientras que el restante 18% presentó cuadros cardíacos, neumónicos o inespecíficos.

Los resultados de las pruebas diagnósticas realizadas en estos casos se exponen en la tabla 13.

Tabla 13. Enfermos inmunodeprimidos VIH+. Casos positivos a toxoplasmosis por PCR. Resultados diagnósticos.

Caso n°	Resultados de PCR			Resultados pruebas serológicas			
	Positivo	negativo	Inhibición	IFI-IgG	ELA-IgM	ELA-IgA	Avidéz-gG
1	Sangre B.pericardio	L.pericárdico		neg.	neg.	neg.	neg.
2	LCR			1:8	neg.	neg.	neg.
3	LCR			1:256	neg.	neg.	neg.
4	LCR			1:256	neg.	neg.	50%
5	Orina	Sangre		1:64	dudoso	neg.	neg.
6	Sangre Orina			1:32	neg.	neg.	neg.
7	LCR			1:32	neg.	neg.	neg.
8	Sangre			1:128	neg.	neg.	50%
9	LCR			SD			
10	LCR			S.D.			
11	LCR			S.D.			
12	LCR			S.D.			
13	LCR			S.D.			
14	B. cerebral Cortes hist.			1:128	neg.	neg.	50%
15	LCR			S.D.			
16	Sangre			1 :1024	neg.	neg.	50%
17	L.broncoalv.			S.D.			

neg.: negativo; S.D.: sin datos.

Los datos serológicos en estos casos no dieron resultados determinantes, por lo que la PCR confirmó el diagnóstico de sospecha de toxoplasmosis o afirmó un diagnóstico no esperado.

En los resultados obtenidos se confirmó el valor de las diversas muestras para la amplificación genómica del ADN de *Toxoplasma gondii*, destacándose la posibilidad de la utilización de las muestras de orina en casos de toxoplasmosis activa.

Las muestras de biopsia cerebral procedían de una paciente (caso 14) previamente diagnosticada de toxoplasmosis cerebral por anatomía patológica, pero que no presentaba respuesta al tratamiento específico. La muestra número uno estaba incluida

en parafina y la muestra número dos era un corte histológico fijado en un portaobjetos. El resultado positivo obtenido por PCR en las dos muestras señala la posibilidad de amplificación de ADN de *T.gondii* en muestras parafinadas. Los resultados positivos confirmaron el diagnóstico previo.

1.2.3.2. Pacientes inmunodeprimidos VIH negativos.

Se estudiaron 28 muestras pertenecientes a pacientes inmunodeprimidos con serología negativa a VIH. El 57% de las muestras analizadas en este grupo provenían de pacientes que presentaban síntomas neumónicos compatibles con infección por *T.gondii* o con otros agentes infecciosos tales como *Pneumocystis carinii*, citomegalovirus, herpesvirus y micobacterias. Los síntomas referidos con más frecuencia fueron neumonía, bronconeumonía, tos, expectoración y fiebre.

El 25% de las muestras procedían de pacientes que presentaban cuadros clínicos neurológicos compatible con posible toxoplasmosis cerebral. El restante 18% de las muestras fue obtenido de pacientes con diferente sintomatología como pericarditis, fiebre y anorexia.

De las muestras estudiadas ocho (28,6%) fueron positivas por PCR (ver tabla 2), pertenecientes a seis pacientes cuyas historias clínicas se resumen en la tabla 14.

Tabla 14. Enfermos inmunodeprimidos VIH negativos. Casos positivos a toxoplasmosis por PCR. Datos clínicos.

<i>Caso número</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Datos Clínicos</i>	<i>Causa inmunodepresión</i>
1	M	52	Tos, expectoración hemoptoica, fiebre	Leucemia mieloide aguda
2	V	49	Neumonía bilateral	Linfoma no Hodking
3	V	12	Neumonía, derrame pleural	Histiocitosis
4	V	6	Neumonía intersticial, anorexia, astenia	Leucemia linfoblástica aguda
5	V	4	Neumonía intersticial	Transplante hepático
6	V	SD	Síntomas neurológicos	SD

SD: sin datos

Cinco (83%) casos positivos mostraron síntomas pulmonares y un caso (17%) afectación neurológica.

Los resultados de las pruebas diagnósticas se engloban en la tabla 15.

Tabla 15. Enfermos inmunodeprimidos VIH negativos. Casos positivos a toxoplasmosis por PCR. Resultados diagnóstico

<i>Caso n°</i>	<i>Resultados de PCR</i>			<i>Resultados pruebas serológicas</i>			
	<i>positivo</i>	<i>negativo</i>	<i>inhibición</i>	<i>IFI-IgG</i>	<i>EIA-IgM</i>	<i>EIA-IgA</i>	<i>Avidex-gG</i>
1	Lav.broncoalv			SD			
2	Lav.broncoalv			SD			
3	Líqu.pleural			SD			
4	2Lav.broncoal 1 LCR			neg.	neg.	neg.	neg.
5	Sangre	Orina		1 :32	neg.	neg.	50%
6	LCR			1 :4096	neg.	neg.	50%

LCR: líquido cefalorraquídeo, SD: sin datos

Las muestras de lavado broncoalveolar y de líquido pleural fueron útiles para realizar la técnica de PCR. En el caso número cuatro, que se trataba de un niño con leucemia en tratamiento con quimioterapia, se detectó el ADN del parásito en dos muestras de lavado broncoalveolar tomadas con quince días de diferencia y sin haber sido instaurado el tratamiento específico frente a *Toxoplasma*, resultando asimismo positiva una muestra de líquido cefalorraquídeo extraída en la segunda toma. El análisis serológico resultó negativo. En el caso número cinco, niño con transplante hepático y neumonía

intersticial, se detectó el parásito en la sangre pero no así en la orina. Las pruebas serológicas mostraron presencia de anticuerpos específicos.

1.2.3.3 Pacientes inmunocompetentes.

Se estudiaron 32 muestras procedentes de pacientes inmunocompetentes. El 31% de las muestras analizadas en este grupo procedió de pacientes con síntomas neurológicos, el 19% de sujetos que referían cuadro pulmonar y el 12% de enfermos con síntomas cardíacos. El 38% restante era de pacientes con diversa sintomatología, tal como adenopatía, miositis, mialgia, cefalea y fiebre.

De las muestras estudiadas se obtuvieron dos positivas (6,2%) por PCR. Una de estas muestra fue un lavado broncoalveolar tomado de un varón de 41 años, VIH negativo y sin causa de inmunosupresión conocida, que presentó un cuadro agudo con neumonía bilateral y fallo multiorgánico, falleciendo rápidamente. Las pruebas serológicas mostraron en la técnica IFI-IgG un título de 1:260, siendo el resto de las técnicas negativas. La otra muestra fue humor vítreo extraído de un paciente no inmunodeprimido y con una coriorretinitis.

1.2.3.4 Mujeres embarazadas.

Se estudiaron 235 muestras procedentes de mujeres embarazadas. Estas muestras fueron tomadas a gestantes que presentaron sospecha de primoinfección por *Toxoplasma gondii* ya que en las pruebas serológicas previamente realizadas se detectó seroconversión o presencia de anticuerpos IgM-específicos, procediendo 141 muestras del estudio epidemiológico reseñado en el apartado 3.

De las muestras analizadas se obtuvieron dos líquidos amnióticos (1.3%) positivos por PCR. Una de las muestras de líquido amniótico fue tomada de una mujer de 25 años que presentó una seroconversión a las 20 semanas de gestación, pasando de ser negativa a tener - tres meses después - los siguientes valores: IFI-IgG título de 1:4096, ELISA-IgM positiva, ELISA-IgA positiva e Índice de Avidéz de IgG de 12.5%. La paciente fue tratada durante la gestación, no obstante el recién nacido presentó una toxoplasmosis congénita (ver caso nº 9 de neonatos).

La otra muestra de líquido amniótico y de sangre positivas, procedió de una mujer de 32 años que presentó por IFI-IgG título de 1:4096, ELISA-IgM positiva, ELISA-IgA positiva e Índice de Aidez de IgG de 6,25% en el segundo trimestre de gestación (ver caso gestante nº5 del apartado 3).

1.2.3.5. Recién nacidos.

Se estudiaron 161 muestras de recién nacidos con sospecha de padecer una toxoplasmosis congénita, bien por los síntomas que mostraron al nacer o bien por ser hijos de mujeres que presentaron una posible primoinfección por *T.gondii* a lo largo del embarazo, aunque fueran asintomáticos en el nacimiento. De éstas, 53 procedieron de los niños seguidos en el estudio epidemiológico expuesto en el apartado 3.

De las muestras analizadas se obtuvieron 26 (16%) positivas por PCR. Estas muestras fueron tomadas de 14 pacientes cuyas historias clínicas se exponen en la tabla 16.

Tabla 16. Recién nacidos positivos a toxoplasmosis por PCR. Datos clínicos.

<i>Caso número</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad (días)</i>	<i>Datos Clínicos</i>
1	M	27	Bajo peso, hidrocefalia, lesiones isquémicas en corteza cerebral
2	M	5	Asintomático. Madre seroconversión en 2º trimestre embarazo
3	M	1	Asintomático. Madre IgM+ durante embarazo
4	M	6	Calcificaciones craneales, bajo peso. Madre con IgM+ embar.
5	V	30	Calcificaciones craneales, hidrocefalia, alteraciones oculares. Madre seroconversión en embarazo.
6	M	24	Calcificaciones craneales. Madre IgM+ en embarazo
7	V	3	Asintomático. Madre IgM+ en embarazo
8	M	14	Hidrocefalia, síntom. Neurológicos. Madre IgM+ en embarazo
9	M	38	Microcefalia. Madre seroconversión en 2º trimestre embarazo
10	V	1	Sepsis neonatal, Asintomático neurológico. Madre seroconversión en 3º trimestre embarazo.
11	V	1	Asintomático. Madre seroconversión en 2º trimestre embarazo
12	V	1	Asintomático. Madre seroconversión en 1º trimestre embarazo
13	M	1	Asintomático. Madre seroconversión en 2º trimestre embarazo
14	V	30	Dilatación ventricular, coriorretinitis, calcificaciones craneales. Madre IgM+ en 3º trimestre embarazo

Seis de los casos (43%) no mostraron síntomas de toxoplasmosis al nacer. Los niños con síntomas (57%) presentaron lesiones craneales o neurológicas, menos uno con sepsis.

Los resultados de las pruebas diagnósticas se exponen en la tabla 17.

Tabla 17. Recién nacidos. Casos positivos por PCR. Resultados diagnósticos

Caso n°	Resultados de PCR			Resultados pruebas serológicas			
	positivo	negativo	inhibición	IFI-IgG	ELI-IgM	ELI-IgA	Avidiz-gG
1	Sangre Orina LCR			2048	posit.	posit.	25%
2	Sangre			4096	posit.	negat.	25%
3	LCR Sangre		Orina	512	negat.	negat.	50%
4	Orina LCR			512	negat.	negat.	50%
5	Sangre LCR	Orina		4096	negat.	negat.	100%
6	Sangre Orina	LCR		256	negat.	negat.	25%
7	Sangre	Orina		2048	negat.	negat.	25%
8	Sangre Orina LCR			4096	negat.	negat.	25%
9	LCR	Sangre	Orina	1024	negat.	negat.	25%
10	LCR			2048	negat.	negat.	25%
11	LCR			1024	negat.	negat.	50%
12	LCR			2048	negat.	negat.	50%
13	Sangre LCR		Orina	2048	dudoso	negat.	25%
14	Sangre	LCR Orina		1024	negat.	negat.	25%

Las pruebas serológicas no fueron determinantes en el 86% de los casos. Los anticuerpos IgG específicos se detectaron en todos los casos, sin tener valor diagnóstico al ser, probablemente, transferidos de la madre. Los anticuerpos IgM específicos sólo se mostraron en dos casos (14%), resultando su valor dudoso en un caso (7%). Los anticuerpos IgA específicos sólo se detectaron en un enfermo (7%).

En el 86% de los casos, la única prueba que determinó la infección por *Toxoplasma gondii* fue la prueba de amplificación genómica por PCR. Se demostró la validez de las

muestras de orina, sangre y líquido cefalorraquídeo para la detección de *T.gondii* en los casos congénitos.

2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN MUJERES GESTANTES EN MADRID. VALORACIÓN DE LAS ACTUALES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.

Durante los años 1996 y 1997 se estudiaron 9846 mujeres embarazadas pertenecientes a las Áreas de salud nº 5 y nº 11 de la Comunidad Autónoma Madrid localizadas en la zona norte y sur de Madrid respectivamente (ver figura 11). Las gestantes del Área nº5 fueron atendidas por el hospital "La Paz" y las pertenecientes al Área nº11 atendidas por el hospital "12 de Octubre" y el Centro de Especialidades de Carabanchel (CEC). De las 9846 mujeres 2836 fueron seguidas en el hospital "La Paz", 2727 en el hospital "12 de Octubre" y 4283 en el CEC, donde se les realizó un estudio serológico para la detección de anticuerpos específicos de *T.gondii*.

Del total de gestantes analizadas, 125 (1.3%) presentaron alguno de los criterios de infección primaria por *Toxoplasma*, previamente fijados. De ellas se siguieron 84 (67.2%) en el estudio de valoración de las técnicas de diagnóstico de la toxoplasmosis y en el estudio de factores de riesgo relacionados con la infección por el parásito, mediante el análisis de las variables asociadas al riesgo, obtenidas en una encuesta epidemiológica. Posteriormente se controlaron 25 (29.8%) recién nacidos de las mujeres seguidas.

2.1. SEROPREVALENCIA E INCIDENCIA DE LA TOXOPLASMOSIS EN MUJERES GESTANTES EN MADRID.

2.1.1. Seroprevalencia.

En el periodo comprendido entre enero de 1996 y diciembre de 1997 fue realizado el cribado para la detección de anticuerpos IgG e IgM específicos frente a *T.gondii*.

Los resultados serológicos obtenidos se presentan en la tabla 18.



Figura 11. Áreas Sanitarias de la Comunidad Autónoma de Madrid

Tabla 18. Resultados serológicos del cribado, según Áreas y años.

Áreas	1996			1997			Total	1996-97	
	Gestantes	IgG +	IgM +	Gestantes	IgG +	IgM +	Gestantes	IgG+	IgM+
Área 5/ H.La Paz	1615	412	8	1221	335	23	2836	747	31
Área 11/ H.12 Oct.	1259	347	21	1468	326	16	2727	673	37
Área 11/ C.E.C.	1777	425	26	2506	657	31	4283	1082	57

En la figura 12 se recoge el número total de casos estudiados por Áreas, señalando los casos que presentaron anticuerpos IgG e IgM, los casos con anticuerpos IgG pero IgM negativos y los casos que fueron negativos para ambas inmunoglobulinas.

El rango de edad de las mujeres embarazadas estudiadas era de 15 a 45 años.

La seroprevalencia de la toxoplasmosis en las mujeres gestantes fue, en 1996, del 25.4% (intervalo de confianza (IC) del 95%, 23.9-27) en el Área 11 y 25.5% en el Área 5 (IC95%, 23.4-27.7), y en 1997 del 24.7% (IC95%, 23.4-26.1) en el Área 11 y 27.4% (IC95%, 24.9-30.0) en el Área 5.

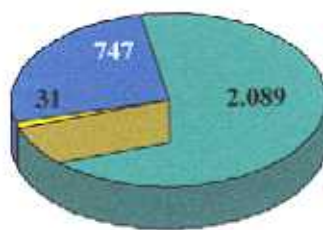
La tabla 19 recoge las seroprevalencias en las dos áreas y la significación estadística.

Tabla 19. Seroprevalencia en el Área 5 y Área 11. Significación estadística.

Año	Área 5			Área 11			Diferencias estadísticas (χ^2 , p=)
	Total	Positivos	Seroprevalencia	Total	Positivos	Seroprevalencia	
1996	1615	412	25%	3036	772	25.4%	No (χ^2 0, p=0,96)
1997	1221	335	27%	3974	983	24.7%	No (χ^2 1.83, p= 0,17)
96-97	2836	747	26.3%	7010	1755	25%	No (χ^2 1.07, p= 0,3)

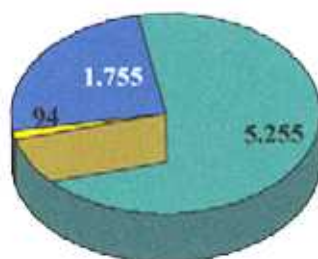
Las tasas de seroprevalencia encontradas en las dos Áreas no presentaron diferencias significativas, por lo que se consideró una seroprevalencia conjunta en mujeres gestantes de Madrid de 25,4% (IC95%, 24.5-26.3) en el periodo estudiado.

Área 5



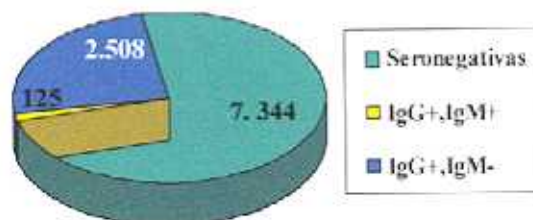
Total 2.867

Área 11



Total 7.104

Total Área 5 y Área 11



Total 9.971

Figura 12. Mujeres embarazadas estudiadas.
Resultados serológicos

La figura 13 muestra las seroprevalencias obtenidas en A) el Área 5, B) en el Área 11 y C) en las dos Áreas analizadas, según los años de estudio.

La figura 14 muestra la evolución de la seroprevalencia en la Comunidad de Madrid, observándose un descenso importante respecto a la encontrada en estudios anteriores (Domingo y col, 1991).

2.1.2. Incidencia

La tasa de incidencia se basó en las gestantes con riesgo de padecer la primoinfección, es decir entre las seronegativas, y se calculó considerando como caso agudo aquella que presentara en la analítica alguno de los criterios de infección primaria preestablecidos: (i) seroconversión de IgG específica, (ii) aumento en cuatro o más veces el título de IgG o (iii) presencia de IgM.

En el cribado realizado desde enero de 1996 hasta diciembre de 1997 se detectaron 125 mujeres embarazadas que presentaban alguno de los criterios de infección reciente por *Toxoplasma gondii*.

La tasa de incidencia observada en el periodo 1996-1997 en el área 5 fue de 14.8‰ (IC 95%, 10.3-21.3) y en el área 11 de 17.9‰ (IC95%, 14.5-21.9), no encontrándose diferencias significativas entre las incidencias de las dos áreas, por lo que se determinó una incidencia global de toxoplasmosis en Madrid durante el periodo 96-97 de 17.02 ‰ (IC95%, 14.2-20.2). La figura 15 recoge en resumen las incidencias globales encontradas en el estudio.

El estudio completo de las mujeres embarazadas que presentaban IgM positiva demostró una primoinfección confirmada en 10 gestantes a lo largo del periodo de estudio, por lo que se determinó una incidencia real de toxoplasmosis en Madrid en el periodo 1996-1997 de 1.4‰ (IC95%, 0.65-2.5).

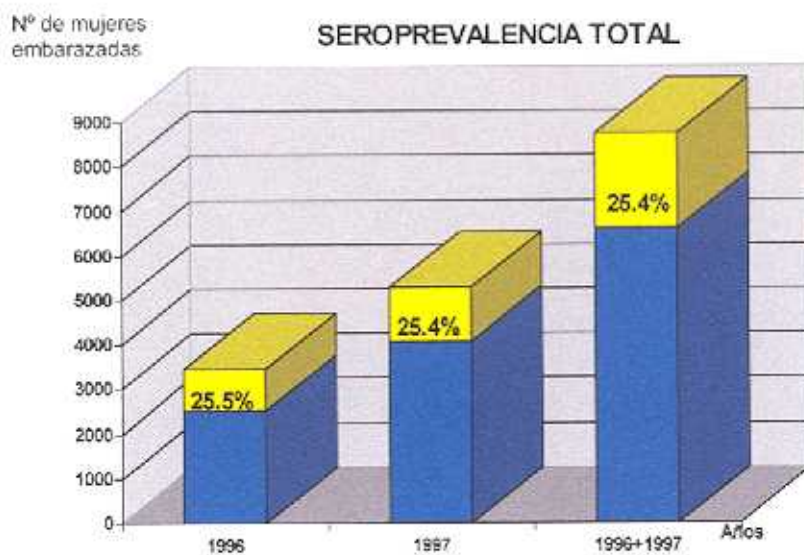
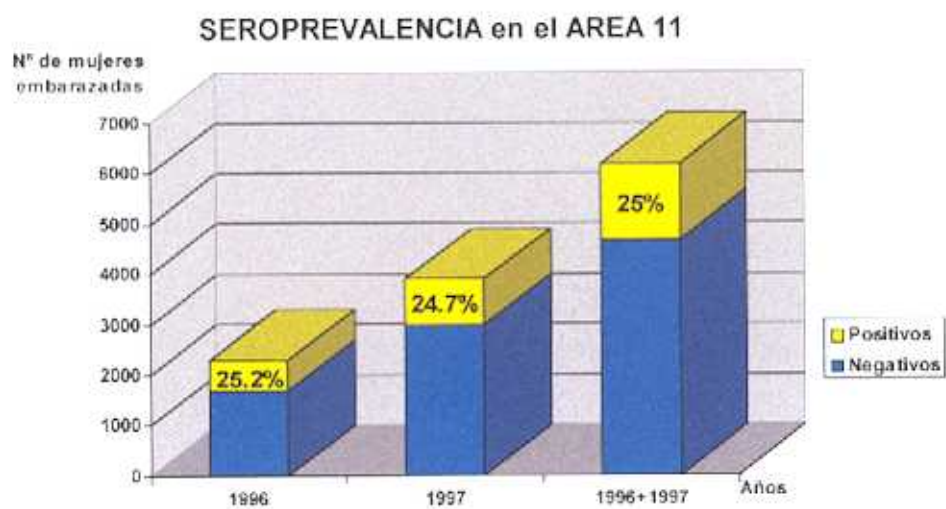
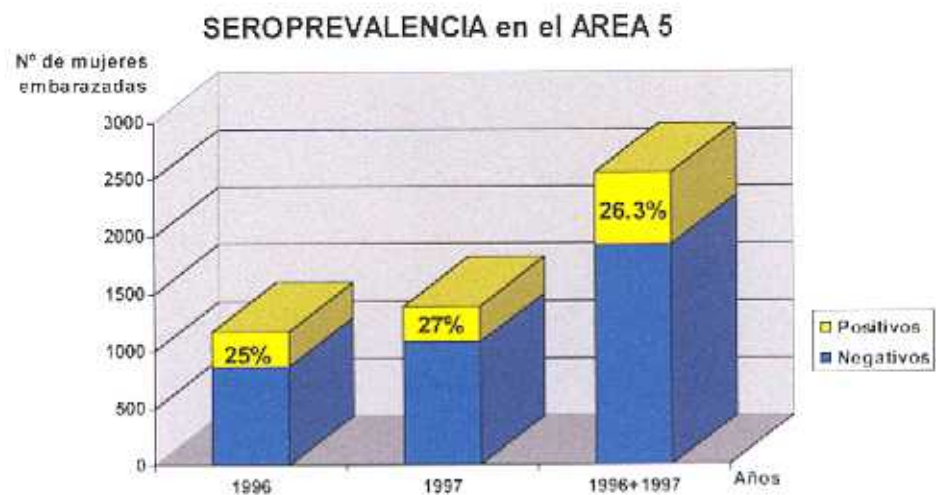


Figura 13. Seroprevalencia de la toxoplasmosis en gestantes.

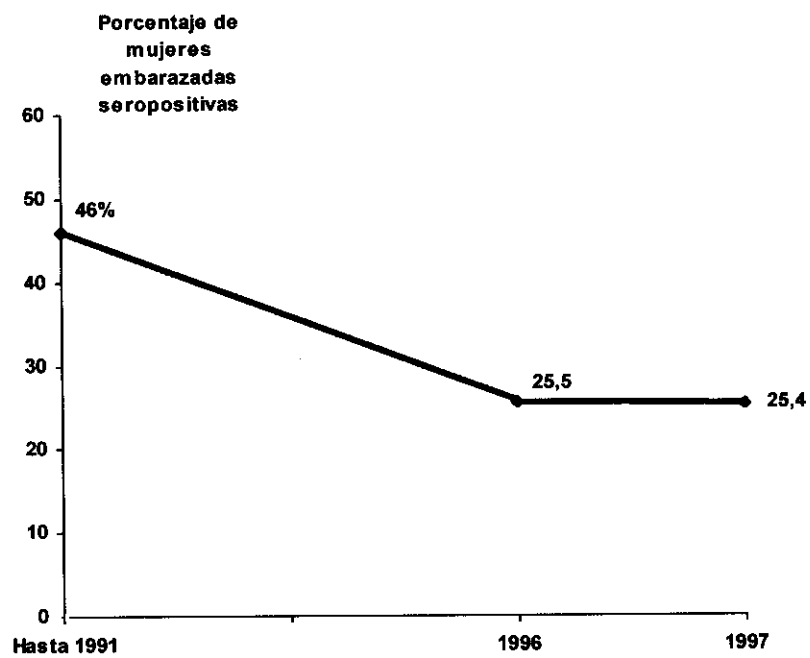


Figura 14. Evolución de la seroprevalencia de toxoplasmosis en gestantes de Madrid

Incidencia (‰)

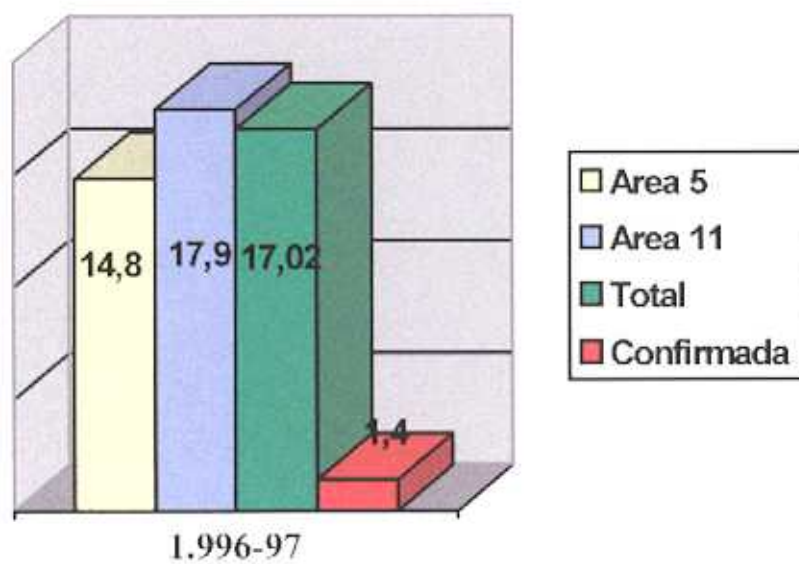


Figura 15. Incidencia de infección por *Toxoplasma* en gestantes de Madrid

2.2 DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS EN MUJERES EMBARAZADAS Y RECIÉN NACIDOS.

Se realizó el diagnóstico de toxoplasmosis en las mujeres embarazadas que presentaron alguno de los criterios de infección primaria establecidos. Las gestantes que participaron en el estudio lo hicieron de forma voluntaria expresa. Aquellas de las que no se obtuvo más que un suero para analizar, sin otro tipo de muestras, ni formalizaron la encuesta epidemiológica, fueron excluidas.

De las gestantes incluidas se solicitó una muestra de orina y sangre completa en la primera extracción una vez detectada la posible primoinfección y muestras de suero a lo largo de la gestación. Se les requirió la presentación del recién nacido después del parto y su seguimiento durante un año para determinar la posible infección por *Toxoplasma gondii*.

En el estudio se controlaron 84 gestantes y acudieron a la revisión 25 (29.8%) hijos de éstas. En el primer trimestre de embarazo fueron detectadas 50 (59.2%) mujeres con sospecha de infección reciente, 26 (31%) en el segundo y ocho (9.9%) en el tercero.

Las muestras de las gestantes y sus recién nacidos fueron remitidas al Servicio de Parasitología del C.N.M. donde se realizó el estudio diagnóstico completo.

2.2.1. Estudio de diagnóstico serológico.

El resultado inicial de los sueros de las mujeres con sospecha de infección activa fue confirmado con las pruebas serológicas completas. De las mujeres seguidas en el estudio se observó que en 49 (58%) no se habían realizado pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos específicos de *T.gondii* anteriores a la realizada en el presente estudio, mientras que 19 (22.6%) sí se habían analizado previamente, dando resultado positivo a la determinación de IgG en 15 (17.9%) y negativo en 4 (4.8%). En 16 (19%) este dato no fue determinado.

A lo largo del seguimiento se obtuvo una segunda extracción en el 87% de las gestantes, del 46.4% tres, del 20.2% cuatro y del 4.8% cinco extracciones.

El número total de sueros analizados en el estudio fue de 217, correspondiendo 84 (38.7%) a una primera extracción, 73 (33.6%) a la segunda, 39 (18%) a la tercera, 17 (7.8%) a la cuarta y 4 (1.8%) a la quinta toma.

A todos los sueros se les realizaron las pruebas de detección de anticuerpos específicos IgG, IgM e IgA y se halló el índice de avidez de IgG.

Detección de anticuerpos IgG

Con la técnica de IFI se detectaron anticuerpos IgG específicos en todos los sueros analizados, menos en uno que fue la primera extracción previa a una seroconversión. Se consideraron las diluciones de 1:8 a 1:64 como títulos bajos, de 1:128 a 1:512 como medios y de 1:1024 a 1:4096 como altos.

En la primera extracción se detectó un suero (1.2%) negativo y dos (2.4%) con títulos bajos correspondientes a seroconversiones, 41(49%) con títulos medios y 40 (47.4%) con títulos altos.

En 78 (93%) casos el título se mantuvo a lo largo del seguimiento, considerándose la variación puntual en una dilución, sin posterior variaciones, como mantenimiento del título. En tres casos (3.6%) se observó un aumento significativo del título, siendo considerados como seroconversiones. En tres casos (3.6%), que presentaban títulos medios, se observó un descenso del título transcurridos cuatro y cinco meses después de la primera extracción.

Se determinó como índice de baja avidez de IgG a los valores inferiores o iguales al 15%, alta avidez a los valores superiores al 25% y valor límite a índices de 16-25%. Se demostró una alta avidez en 57 (67.9%) casos, baja avidez en seis (7.1%) y un valor límite en 21 (25%).

En los casos en los que se detectó inicialmente un índice demostrativo de alta avidez, éste se mantuvo en las sucesivas extracciones analizadas. El índice de baja avidez en dos de las seis mujeres seguidas se mantuvo hasta los tres meses, momento en que pasó a dar un valor límite, mientras que en otras dos se convirtió al mes siguiente en valor límite. Por fin, en los dos últimos casos sólo se obtuvo una segunda muestra un mes después de la primera y en ella se mantenía el índice de baja avidez.

Se observó que en los casos en los que se determinó inicialmente un índice de avidez con valor límite, éste se mantuvo igual en ocho casos (38%); en cinco de ellos ese valor límite perduró durante uno o dos meses y en otros tres casos, se mantuvo cuatro o cinco meses después de la primera extracción. Por el contrario en trece casos (61.9%) se destacó la evolución hacia la alta avidez en la siguiente extracción, realizada tres meses después de la primera.

Detección de anticuerpos IgM.

En todos los casos se detectaron anticuerpos IgM específicos.

En 77 mujeres (91.6%) seguidas se observó la presencia de IgM en todas las extracciones analizadas, siendo el seguimiento desde un mes tras la primera detección hasta 15 meses. El periodo de seguimiento dependió del mes de gestación en el que se encontraba la mujer embarazada cuando se detectó la serología positiva y del nivel de participación en el estudio de la paciente.

En la tabla 20 se recogen los casos analizados y el periodo de persistencia de IgM observado.

Tabla 20. Embarazadas analizadas con persistencia de IgM

<i>N° de casos</i>	<i>% (total de gestantes)</i>	<i>Periodo de seguimiento*</i>
27	32.7%	1 mes
10	11.9%	2 meses
5	6%	3 meses
3	3.5%	4 meses
4	5%	5 meses
2	2.4%	6 meses
7	8.3%	7 meses
2	2.4%	8 meses
3	3.6%	9 meses
1	1.2%	10 meses
1	1.2%	12 meses
1	1.2%	15 meses
Total 77 casos	91.6%	1-15 meses

*Periodo de seguimiento: Tiempo que se siguió a las embarazadas tras la primera detección de IgM + y durante el cual se observó la presencia de IgM, no realizándose extracciones posteriores.

En siete casos (8.4%) se observó la desaparición de los anticuerpos IgM a lo largo del seguimiento, en dos (28.6%) desaparecieron al mes de la primera extracción, en uno a los dos meses y en cuatro casos (57.14%) entre tres y cuatro meses después de la primera extracción.

Detección de anticuerpos IgA.

Se detectaron anticuerpos específicos de la clase IgA en 10 casos (11.9%) estudiados, no apareciendo ese anticuerpo en 74 (88.1%). Se observó la desaparición de la IgA específica a lo largo del seguimiento en siete mujeres (70%). En cuatro (57%) este anticuerpo no se detectó en la muestra tomada al mes de la primera extracción, en una embarazada a los dos meses y en dos (28.5%) a los tres meses.

En tres gestantes (30%) se detectó la presencia de IgA en el seguimiento, observándose en un caso al mes de la primera muestra, en otro a los dos meses y en el tercero (33.3%) a los tres meses.

Primoinfecciones

Mediante las pruebas serológicas completas se confirmó la primoinfección por *Toxoplasma gondii* en diez mujeres (11.9%) embarazadas controladas. Para ello se siguió el criterio de considerar como primoinfección el caso que mostrara alguna de las siguientes condiciones: (i) seroconversión, (ii) presencia de IgM y bajo índice de avidez de IgG o (iii) presencia de IgM e IgA con índice de baja avidez o valor límite.

La tabla 21 recoge el trimestre de embarazo en el que se detectó la primoinfección y los resultados serológicos.

Tabla 21. Mujeres embarazadas con primoinfección. Resultados serológicos

Caso n°	Trimestre*	Día extr.**	Resultados serológicos				Hijo
			IFI-IgG	EIA-IgM	EIA-IgA	Avidez-IgG	
1	1	0	1:64	+	+	6.25%	Seguido
		16	1:512	+	+	6.25%	
		30	1:2048	+	-	25%	
2	2	0	1:32	+	+	-	No seguido
		94	1:2048	+	+	6.25%	
		110	1:4096	+	-	6.25%	
		153	1:4096	+	-	25%	
3	2	0	-	-	-	-	No seguido
		105	1:4096	+	+	6.25%	
		150	1:2048	+	+/-	25%	
		390	1:1024	+	-	50%	
4	2	0	-	-	-	-	Seguido
		90	1:256	+	+	6.25%	
		105	1:512	+	-	25%	
5	2	0	1:4096	+	+	6.25%	No seguido
6	1	0	1:2048	+	+	12.5%	Aborto
		15	1:4096	+	+	12.5%	
7	1	0	1:256	+	+	25%	Seguido
		16	1:512	+	-	25%	
8	1	0	1:4096	+	+	25%	Aborto
		15	1:8192	+	+	25%	
		225	1:2048	+	-	50%	
9	2	0	1:4096	+	+	25%	No seguido
		60	1:4096	+	-	25%	
		360	1:4096	+	-	50%	
10	2	0	1:1024	+	+	25%	Seguido
		15	1:1024	+	-	50%	

*Trimestre de gestación en el que se detectó la primoinfección ** Día de la extracción. + : positivo, -: negativo, +/-: dudoso

De las primoinfecciones estudiadas, cuatro fueron detectadas en el primer trimestre de gestación y seis en el segundo. En cuatro casos, reflejados en la tabla como números

1,2,3 y 4, se observaron seroconversiones de IgG junto con presencia de anticuerpos específicos IgM e IgA y se obtuvieron índices de baja avidez de IgG. En dos casos (números 5 y 6) se detectaron índices de baja avidez junto con anticuerpos IgM e IgA. En cuatro casos (números 7, 8, 9 y 10) se determinó la presencia de IgM e IgA junto con un valor límite en el índice de avidez de IgG.

Los títulos de IgG se mantuvieron altos en ocho casos y medios en dos (números 4 y 7), resaltándose que en el caso 4, siendo una seroconversión, no presentó títulos altos en el periodo de estudio.

En seis primoinfecciones se observó un índice de baja avidez que se mantuvo como tal en el caso 2 hasta los cuatro meses, mientras que a los cinco meses mostró un valor límite. En las mujeres 1, 3 y 4 el índice se convirtió al mes siguiente en valor límite. En la 6 se obtuvo una segunda muestra quince días después de la primera y en ella se observó la persistencia del índice de baja avidez. En el caso 5 sólo se analizó una muestra que presentó baja avidez.

En las mujeres 7, 8, 9 y 10 (40%) se obtuvo un índice de avidez con valor límite manteniéndose como tal en la extracción efectuada 15 días después en los casos 7, 8 y 10. En el 8 se observó alta avidez a los 7 meses. En la primoinfección 9 se obtuvo un índice con valor límite a los dos meses, pasando a ser alto en el control efectuado a los 12 meses.

En todos los casos los anticuerpos IgM específicos se mantuvieron a lo largo del seguimiento.

Se detectaron anticuerpos IgA específicos en todos los casos, observándose su desaparición a lo largo del seguimiento en ocho casos. La mujer número 5 no fue seguida y la 6 mantuvo IgA en la siguiente extracción tomada 15 días después. En los casos 4, 7 y 10 este anticuerpo no se detectó en la muestra tomada a los 15 días de la primera extracción y en el caso 9 en la tomada a los dos meses. En las primoinfecciones 1 y 8 sí se detectó a los 15 días pero no al mes y a los siete meses respectivamente. En los casos 2 y 3 se vio IgA específica a los tres y dos meses no detectándose a los cuatro y trece meses.

En el caso 6, que presentó índice de baja avidez de IgG, y en el caso 8, que mostró anticuerpos IgA e índice de avidez con valor límite, se produjeron abortos antes de los

tres meses de gestación, no pudiendo ser comprobado si fueron originados por *Toxoplasma*. En el resto de los casos la gestación llegó a término, siendo seguidos en el estudio los recién nacidos de los casos 1, 4, 7 y 10.

Recién nacidos

Los 25 recién nacidos controlados fueron revisados clínicamente por el pediatra y seguidos serológicamente durante el tiempo que presentaron anticuerpos IgG específicos residuales de la madre.

Todos los neonatos presentaron anticuerpos IgG específicos en el nacimiento, seis (24%) con títulos bajos, diez (40%) con medios y nueve (36%) con altos. El índice de alta avidez de IgG apareció en 22 (88%) casos y en tres (12%) se obtuvo un valor límite.

El descenso de los títulos de IgG se observó en sucesivas extracciones, negativizándose en todos los niños entre uno y seis meses después del nacimiento. Ninguno de los recién nacidos presentaron anticuerpos específicos IgM o IgA al nacer.

La tabla 22 recoge los resultados serológicos obtenidos en el control realizado a los recién nacidos de las mujeres primoinfectadas y el periodo que se les siguió.

Tabla 22. Recién nacidos seguidos de embarazadas con primoinfección. Resultados serológicos.

<i>Neonato de Primoinfectada n°</i>	<i>Día extracción</i>	<i>Resultados serológicos</i>			
		<i>IgG-IgG</i>	<i>EIA-IgM</i>	<i>EIA-IgA</i>	<i>Avidez-IgG</i>
1	0	1:1024	neg.	neg.	50%
	90	1:64	neg.	neg.	50%
	180	neg.	neg.	neg.	neg.
4	0	1:4096	neg.	neg.	25%
	30	1:512	neg.	neg.	50%
	120	1:128	neg.	neg.	100%
	240	-	neg.	neg.	neg.
7	0	1:250	neg.	neg.	50%
	30	neg.	neg.	neg.	neg.
10	0	1:64	neg.	neg.	50%
	35	neg.	neg.	neg.	neg.

neg.: negativo

2.2.2. Estudio de detección de *Toxoplasma gondii*.

Una vez detectadas por serología las posibles infecciones activas al presentar anticuerpos IgM específicos, se tomó a las embarazadas una muestra de sangre y orina y, de aquellas cuyo ginecólogo lo consideró oportuno, una muestra de líquido amniótico. En la mayoría de los casos el tiempo mínimo transcurrido desde la extracción de la primera muestra de suero hasta que se contactó con la embarazada y pudo tomarse las muestras de sangre y orina fue de 15 días, encontrándose en algunos casos en tratamiento específico.

Las muestras que reunían las condiciones adecuadas fueron utilizadas para el aislamiento del parásito por inoculación en ratón y para la detección del ADN de *T.gondii* por PCR secuencial interna.

Se analizaron un total de 141 muestras, obtenidas a partir de 70 (83.3%) de las gestantes seguidas, entre las que se encontraron los diez casos considerados como primoinfección tras el estudio serológico completo.

Las muestras procesadas fueron 66 de sangre (46.8%), 70 de orina (49.7%) y cinco muestras de líquido amniótico (3.5%).

La tabla 23 agrupa los tipos de muestras analizadas en las gestantes controladas en el estudio.

Tabla 23. Embarazadas. Muestras analizadas

<i>N° de casos (%)</i>	<i>Muestras analizadas</i>		
	<i>Sangre</i>	<i>Orina</i>	<i>L.amniótico</i>
a) 5 embarazadas (7)	X	X	X
b) 61 embarazadas (87)	X	X	-
c) 4 embarazadas (6)	-	X	-
Total.....70 (100)	66	70	5

X muestra analizada, -: muestra no analizada

Nueve (12.8%) muestras de sangre, diez (14.3%) de orina y cuatro (80%) de líquido amniótico procedieron de las gestantes con primoinfección, distribuyéndose como se muestra en la tabla 24.

Tabla 24. Embarazadas con primoinfección. Muestras analizadas.

<i>Casos de Primoinfección n°</i>	<i>Muestras analizadas</i>		
	<i>Sangre</i>	<i>Orina</i>	<i>L. Amniótico</i>
1, 4, 5 y 7	X	X	X
2, 3, 6, 8 y 10	X	X	-
9	-	X	-

Recién nacidos

Se analizaron 53 muestras procedentes de 23 (92%) recién nacidos, siendo 26 (49%) de sangre, 21(40%) de orina y siete (11%) de líquido cefalorraquídeo.

En la tabla 25 se muestran los tipos de muestras analizadas en los distintos casos, agrupándose los neonatos según las muestras analizadas. A uno de los neonatos incluidos en el grupo a) se le tomaron cuatro extracciones de sangre, una de orina y una de LCR, y a otro de los neonatos pertenecientes a este grupo se le tomó tres extracciones de sangre y una orina, con intervalos de uno o dos meses. Estos dos niños eran hijos de madres a las que se les detectó primoinfección en el embarazo (casos 1 y 4). A tres niños incluidos en el grupo b) se les tomó dos muestras de sangre y una orina. Al resto de los niños sólo se les tomó una muestra de cada tipo, según el grupo en el que están incluidos.

Tabla 25. Recién nacidos. Muestras analizadas

<i>N° de casos (%)</i>	<i>Muestras analizadas</i>		
	<i>Sangre</i>	<i>Orina</i>	<i>LCR</i>
a) 4 neonatos (17)	X	X	X
b) 13 neonatos (56)	X	X	-
c) 2 neonatos (9)	-	X	X
d) 3 neonatos (14)	-	X	-
e) 1 neonato (4)	X	-	-
Total.....23 (100)	26	21	6

X muestra analizada, -: muestra no analizada

2.2.2.1. Detección del ADN de *Toxoplasma gondii* por PCR

Se analizaron las 141 muestras tomadas de las gestantes en estudio, por la técnica de amplificación genómica del ADN de *T. gondii* mediante la PCR secuencial interna.

En la tabla 26 se exponen los resultados obtenidos mediante esta técnica en las diversas muestras estudiadas de las gestantes controladas. Se observó que de las muestras de sangre 64 (97%) dieron resultado negativo por PCR, una (1.5%) resultó positiva y otra presentó inhibición a la amplificación.

La técnica de amplificación en las muestras de orina fue negativa en 65 casos (92.9%) y en cinco (7.1%) hubo presencia de inhibidores inespecíficos.

De las cinco muestras de líquido amniótico, tres resultaron negativas, una positiva y en otra hubo presencia de inhibidores.

Las muestras de sangre y líquido amniótico positivas procedieron de una mujer con primoinfección en el segundo trimestre de gestación (caso 5).

Tabla 26. Detección de *T. gondii*. Resultados de PCR en muestras de embarazadas.

<i>Muestra</i>	<i>Número (%)</i>	<i>Resultados PCR</i>		
		<i>negativo (%)</i>	<i>positivo (%)</i>	<i>Inhibición (%)</i>
Sangre	66 (46.8%)	64 (97%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)
Orina	70 (49.6%)	65 (92.9%)	0	5 (7.1%)
L. amniótico	5 (3.6%)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)
Total	141 (100%)	132 (93.6%)	2 (1.4%)	7 (5%)

En la tabla 27 se presentan los resultados obtenidos por la técnica de PCR en las muestras analizadas de las mujeres primoinfectadas.

Tabla 27. Embarazadas con primoinfección. Resultados de PCR.

<i>Caso n°</i>	<i>Resultados PCR</i>		
	<i>Sangre</i>	<i>Orina</i>	<i>L. amniótico</i>
1	neg.	neg.	inhib.
2	neg.	neg.	NR
3	neg.	neg.	NR
4	neg.	neg.	neg.
5	posit.	neg.	posit.
6	neg.	neg.	NR
7	neg.	neg.	neg.
8	neg.	neg.	NR
9	NR	neg.	NR
10	neg.	neg.	NR

posit: positivo, neg: negativo, inhib : inhibición, NR: no realizado

Recién nacidos

Se analizaron 53 muestras de recién nacidos por la técnica de PCR interna, siendo 26 de sangre (49%), 21 de orina (39.6%) y seis de líquido cefalorraquídeo (11.3%). En la tabla 28 se muestran los resultados obtenidos.

De las muestras de sangre, una (3.8%) presentó resultado positivo por PCR y las restantes 25 negativas. Las muestras de orina fueron negativas en 20 (95.2%) casos y una presentó reacción de inhibición. Una de las cinco muestras de líquido cefalorraquídeo fue positiva, resultando las restantes negativas.

Tabla 28. Detección de *T.gondii*. Resultados de PCR en muestras de recién nacidos.

<i>Muestra</i>	<i>Número de</i>		<i>Resultados PCR</i>		
	<i>Muestras</i>	<i>(%)</i>	<i>negativo</i>	<i>positivo</i>	<i>Inhibición</i>
Sangre	26	(49%)	25 (96.2%)	1 (3.8%)	0
Orina	21	(39.6%)	20 (95.2%)	0	1 (4.8%)
LCR	6	(11.3%)	5 (83.3%)	1 (16.7%)	0
Total	53	(100%)	45 (84.9%)	2 (3.8%)	1 (1.9%)

Las muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo positivas en la PCR interna procedían de una recién nacida a cuya madre, en el tercer trimestre de gestación, se le detectó IgM positiva e índice de alta avidéz de IgG, no habiendo sido incluida en el grupo considerado como primoinfección. Esta niña no presentó anticuerpos específicos IgM e IgA en los resultados serológicos, fue sometida a tratamiento específico y a los seis meses se observó su seronegatividad.

En la tabla 29 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de los neonatos de las mujeres consideradas primoinfectadas.

Tabla 29. Recién nacidos de embarazadas con primoinfección. Resultados de PCR.

<i>Neonato de Caso n°</i>	<i>Día extracción</i>	<i>Resultados PCR</i>		
		<i>Sangre</i>	<i>Orina</i>	<i>LCR</i>
1	0	-	-	-
	40	-	-	-
	90	-	Inhib.	NR
	180	-	NR	NR
4	0	-	Inhib.	-
	30	inhib.	-	NR
	120	-	-	NR
7	0	-	-	NR
10	0	-	-	NR
	35	-	-	NR

-: negativo, Inhib.: inhibición, NR: no realizado

2.2.2.2. Aislamiento por inoculación en ratón.

109 muestras procedentes de 55 gestantes en seguimiento se inocularon por vía intraperitoneal a ratón. Entre ellas se incluyen las tomadas en los diez casos considerados como primoinfección. Se analizaron 52 (47.7%) muestras de sangre, 52 (47.7%) de orina y cinco (4.6%) de líquidos amnióticos. Entre éstas se procesaron una de sangre, de orina y de líquido amniótico de los casos 1, 4 y 7; una muestra de sangre y de orina de los casos 2, 3, 6, 8 y 10 y una muestra de orina del caso 9.

El aislamiento en ratón fue negativo en todos los casos.

Recién nacidos

Se inocularon a ratón 41 muestras procedentes de 20 recién nacidos, de ellas fueron 20 de sangre y 21 de orina. Entre estas muestras se analizaron una de orina y otra de sangre de los cuatro hijos seguidos de las madres con primoinfección, y una toma de sangre de la niña que había sido positiva por la técnica de PCR, aunque se inoculó una cantidad mínima por falta de muestra.

El aislamiento en ratón fue negativo en todos los casos.

2.3 ANÁLISIS DE VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS IMPLICADAS EN LA TOXOPLASMOSIS.

Los factores de riesgo asociados a la infección primaria por *Toxoplasma gondii* han sido analizados en un estudio de casos y controles.

Los casos analizados correspondieron a las 84 mujeres embarazadas seguidas en el estudio de valoración de las técnicas de diagnóstico.

Se seleccionaron como controles 92 mujeres embarazadas que acudieron a la consulta de ginecología en los mismos hospitales y centro de especialidades que las mujeres seleccionadas como casos. Estas mujeres fueron elegidas de forma aleatoria. El criterio de selección aplicado fue no presentar anticuerpos específicos frente a *T.gondii* en las pruebas serológicas realizadas durante el embarazo.

Las variables asociadas a riesgos se expusieron en un cuestionario que se realizó por entrevista personal tanto a los casos como a los controles.

El cuestionario recogió información sobre:

- Variables de edad, trimestre de gestación y síntomas presentados.
- Variables relacionadas con los hábitos en la alimentación cárnica: consumo de carne, forma de preparación de la carne, manejo de carne cruda, consumo de hamburguesas y consumo de embutidos.
- Variable relacionada con las medidas higiénicas en el consumo de verduras y frutas.
- Variables relacionadas con los hábitos y contactos con gatos: con gatos propios caseros, con gatos en el entorno.
- Variables relacionadas con los hábitos de contacto con la tierra: jardinería, juegos y trabajo en campo.
- Variable referida al trabajo profesional relacionado con la carne. (Anexo ficha)

La información recogida fue introducida en una base de datos creada con el programa Epi Info (6.04), procediéndose al análisis estadístico de los datos.

Los resultados obtenidos en el análisis de las diversas variables fueron los siguientes:

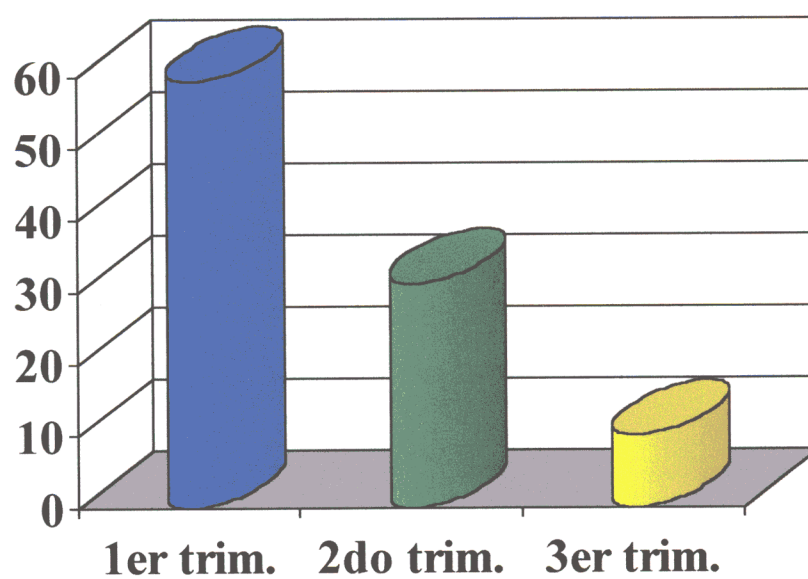
Edad : Se obtuvo este dato en el 82.1% (69/84) de los casos y en el 96.7% (89/92) de los controles. El rango de edad observado fue de 17 a 38 años en los casos y de 18 a 40 años en los controles

Se observó que el 56.3% (89/158) de las gestantes en estudio tenía entre 28 y 32 años, siendo el 59.4% (41/69) en los casos y el 53.9% (48/89) en los controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de esta variable dependiendo de las embarazadas que habían pasado o no la enfermedad.

Trimestre de gestación

En la figura 16 se muestra el trimestre de gestación en que fueron estudiadas las mujeres incluidas en los grupos control y de casos. Se observó una diferencia significativa entre los trimestres de gestación en los que se realizó el estudio, encontrándose una proporción 9.87 veces mayor de mujeres positivas estudiadas en el primer trimestre frente a las mujeres estudiadas en los trimestres segundo y tercero (OR 9.87, (4.21-23.65) χ^2 37.39 p<0.001).

FRECUENCIA %



TRIMESTRE DE GESTACIÓN

Figura 16. Trimestre de la gestación en el que se detectó la posible primoinfección en las gestantes estudiadas.

En la tabla 30 se expone el resumen de los datos obtenidos en el estudio del resto de las variables, junto con los resultados más interesantes del análisis estadístico realizado.

Tabla 30. Variables asociadas a riesgo. Análisis estadístico.

<i>Variable</i>	<i>Casos gestantes +</i>	<i>Control gestantes -</i>	<i>OR</i>	<i>(IC)</i>	<i>χ^2</i>	<i>p</i>
Presentación de <i>síntomas</i>	14/53	13/79	2.1	0.84-5.46	3.2	0.07
<i>Alimentación cárnica</i>						
Comer carne frita en hogar	68/68	89/92	-	-	0.8	0.36
Preparación poco hecha	28/68	14/75	3.7	1.67-8.5	12.7	<0.001
Frecuencia > 1 vez semana	59/64	83/89	0.8	0.22-3.41	0.06	0.8
Manejo carne frecuente	30/62	30/59	1.8	0.90-379	3.29	0.07
Comer carne frita fuera hogar	53/67	52/92	2.9	1.33-6.43	8.82	0.003
Preparación poco hecha	23/53	6/52	5.8	1.96-18.41	18.3	<0.001
Frecuencia > 1 vez semana	46/81	49/86	0.9	0.51-1.92	0.00	0.98
<i>Consumo hamburguesas</i>	28/67	46/92	0.7	0.36-1.43	1.05	0.30
Frecuencia > 1 vez semana	9/28	1/46	21.3	2.43-481	13.4	<0.001
<i>Consumo embutido</i>	63/66	83/92	2.2	0.54-13.54	1.5	0.2
Tipo (casero, industrial)	5/62	4/81	1.69	0.37-7.91	0.58	0.44
Frecuencia > 1 vez semana	46/58	58/82	1.62	0.62-3.87	1.31	0.25
<i>Lavar verduras</i>	66/67	85/87	1.55	0.11-45.03	0.13	0.71
Contacto con gatos	25/71	17/92	2.55	1.17-5.59	6.79	0.009
Gatos en casa	17/18	8/9	2.13	0.00-93.64	0.27	0.6
Gatos edad	12/13	5/6	2.4	0.00-116.9	0.35	0.5
Gatos con salidas externas	7/10	2/5	35	0.24-64.8	1.25	0.28
Gatos cuidados	9/11	5/8	2.7	0.23-37	0.89	0.33
Gatos entorno	25/63	30/83	1.16	0.56-2.41	0.19	0.66
<i>Contactos con tierra</i>						
Jardinería	28/67	32/86	1.21	0.60-2.45	0.33	0.5
Otros contactos con tierra	4/63	12/74	0.42	0.11-1.5	2.19	0.13
<i>Trabajos relacionados con carne</i>	3/66	2/86	2	0.26-17.97	0.58	0.4

Manifestación de síntomas: No se observaron diferencias significativas entre las mujeres que presentaron síntomas compatibles con toxoplasmosis en el tiempo periconcepcional y gestacional y las que no los mostraron.

Alimentación cárnica: Se analizaron las variables relacionadas con los hábitos en la alimentación cárnica.

(i) Consumo en el hogar:

El 98% (157/160) de las mujeres manifestaron comer carne frita, no encontrándose diferencias significativas entre los casos y los controles. En la forma de preparación de la carne se observó una clara diferencia significativa, hallándose una probabilidad de enfermar comiendo carne poco hecha 3.75 veces mayor que comiéndola normal o hecha.

La frecuencia de comer carne no presentó diferencias significativas en los estratos presentados, no observándose tampoco diferencias significativas entre comer carne menos de una vez por semana o más de una vez por semana.

Con la variable de “manejo de carne cruda” se determinaba el hábito de preparar la carne o de cocinar carne picada (albóndigas, hamburguesas) en su casa. De las mujeres entrevistadas el 76% (115/151) manejaban la carne. No se encontraron diferencias significativas entre el manejo de carne frecuente y el esporádico o no manejo de carne.

(ii) Consumo fuera del hogar:

El 66% (105/54) de las mujeres encuestadas manifestaron comer carne frita fuera del hogar (restaurantes, bares, etc). Se observó una diferencia significativa entre las que comían carne y las que no comían carne, obteniéndose una probabilidad de 2.9 veces mayor de padecer toxoplasmosis en las mujeres que comían carne fuera del hogar frente a las que no la comían.

En la forma de preparación de la carne que se tomaba, se observó igualmente una clara diferencia significativa, hallándose una probabilidad de enfermar comiendo carne poco hecha fuera del hogar 5.88 veces mayor que comiéndola normal o hecha.

El estudio de la frecuencia de comer carne fuera del hogar no presentó diferencias significativas.

Consumo de hamburguesas: El hábito de consumo de hamburguesas fuera del hogar se observó en 46.5% (74/159) de las mujeres seguidas, no obteniéndose diferencias significativas entre las que comían o no comían éstas en los casos y los controles.

El consumo de hamburguesas más de una vez por semana o menos de una vez por semana presentó diferencias significativas, encontrándose una proporción de enfermar 21.3 veces mayor en aquellas mujeres que comían hamburguesas más de una vez por semana frente a las que las comían menos de una vez por semana.

Consumo de embutido: El 92.4% (146/158) de las mujeres refirieron consumir embutido, no encontrando diferencias significativas entre el hábito de comer o no embutido. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre comer embutido casero o industrial ni entre la frecuencia del consumo menor de una vez por semana y mayor de una vez por semana.

Consumo de verduras y frutas: Se analizó la costumbre de lavar las verduras y frutas como medida higiénica, encontrando que el 98% (151/154) de las mujeres lavaban las verduras, no existiendo diferencias significativas entre los grupos analizados.

Contactos con gatos: El 73.6% (120/163) de las mujeres encuestadas manifestaron no tener relación con gatos caseros. Se observó que la probabilidad de enfermar era 2.5 veces superior en las mujeres que tenían contactos con gatos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar las variables de tener gato en casa, edad del gato, hábito de salidas externas del gato y la costumbre de realizar directamente los cuidados del gato. No se encontraron diferencias significativas en la variable de tener relación esporádica o frecuente con gatos del entorno.

Contactos con tierra: El 60% (93/153) de las mujeres no realizaban ninguna labor relacionada con la jardinería. No se encontraron diferencias significativas entre las mujeres que habían padecido toxoplasmosis o las sanas en cuanto a la variable de realizar de forma frecuente o esporádica o no realizar labores de jardinería. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre tener o no otros contactos con la tierra.

Profesión: El 3.3% (5/147) de las mujeres manifestaron haber realizado un trabajo relacionado con el manejo de carne. No se encontraron diferencias significativas en el estudio de esta variable.

3. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Toxoplasma gondii* CON TÉCNICAS MOLECULARES.

3.1. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LAS CEPAS DE *Toxoplasma gondii*

Se desarrolló una tipificación genómica de las cepas basada en el polimorfismo del ADN del gen SAG2 de *T.gondii*, en la que se diferenciaron los tres tipos predominantes descritos en *Toxoplasma*, siguiendo el método de Howe y col, 1997.

Para ello se realizó la amplificación por separado del extremo 5' y del extremo 3' del gen SAG2, como se esquematiza en la figura 17. Las amplificaciones de los extremos 5' y 3' del gen SAG2 se llevaron a cabo por dos PCR secuenciales internas independientes. Estas fueron estandarizadas y optimizadas siguiendo los pasos expuestos en el apartado 1.1. para determinar las condiciones de la mezcla de reacción y los ciclos de amplificación. Se valoró especialmente la utilización de las enzimas *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer, Cetus) y *Tth* (Biotools), siendo esta última la que demostró mejores resultados. El proceso de caracterización se realizó en muestras con presencia de ADN contaminante del hospedador.

La amplificación del extremo 5' consiguió un producto de amplificación de 241 pb y la del extremo 3' uno de 221 pb (figura 18).

Para la valoración de la técnica se procesaron las cepas de referencia RH, C-56, Beverly y MC-49. Se utilizó como muestra el ADN extraído del líquido ascítico, en el caso de la cepa RH, y de los cerebros de ratones inoculados con el resto de las cepas. Estas muestras habían sido positivas previamente en la PCR nested de amplificación del gen B1 de *T.gondii*. Como control se sometieron al mismo análisis muestras procedentes de ratones no parasitados. En las muestras control no se observó amplificación específica.

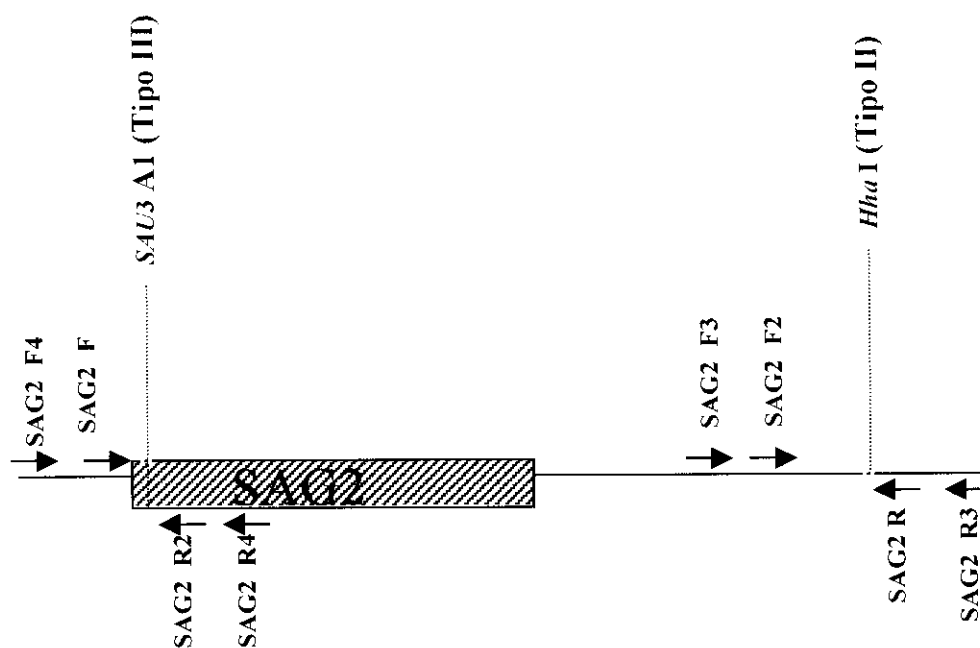


Figura 17. Esquema del locus *SAG2*, mostrando la localización de los cebadores usados en la amplificación por PCR interna de los extremos 5' y 3', y los sitios de restricción utilizados para la identificación del genotipo.

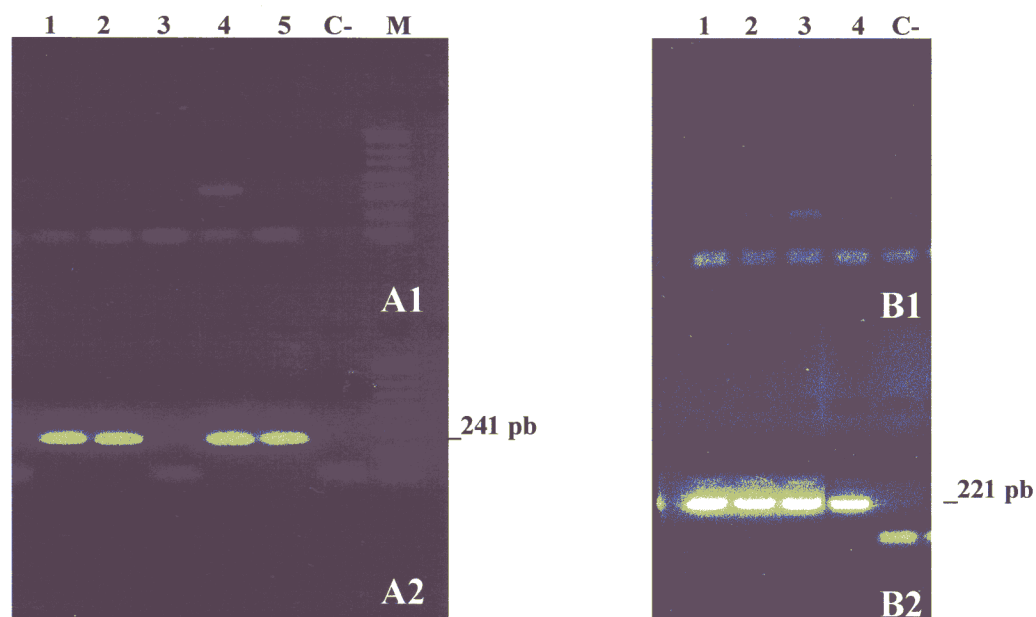


Figura 18. Amplificación por PCR secuencial interna de los extremos 5' y 3' del gen SAG2.

(A) Amplificación del extremo 5'.

(A1) Productos de amplificación de la 1ª PCR.

(A2) Productos de amplificación de la 2ª PCR.

Calles 1-5: Cepas RH, Beverly, Ov80, C56 y Ov86 respectivamente. **Calle C-:** Control negativo (sin ADN). **Calle M:** Marcador PCR 100-2000 pb.

(B) Amplificación del extremo 3'.

(B1) Productos de amplificación de la 1ª PCR.

(B2) Productos de amplificación de la 2ª PCR.

Calles 1-4: Cepas RH, Beverly, C56 y Ov86 respectivamente. **Calle C-:** Control negativo (sin ADN).

Una vez obtenido el producto de amplificación de los dos extremos del gen SAG2 de cada una de las cepas de referencia, se procedió a la digestión con enzimas de restricción.

La digestión del producto de amplificación del extremo 5' con la enzima de restricción *Sau3AI* distinguió el alelo 3 (cepas de tipo III) de los alelos 1 y 2 (cepas de tipo I y II). La digestión del producto de amplificación del extremo 3' con la enzima *HhaI* diferenció el alelo 2 (cepas de tipo II) de los alelos 1 y 3 (cepas de tipo I y II) como se expone en la figura 19.

El patrón de digestión que se observó demostró que el producto de amplificación de los dos extremos de las cepas pertenecientes al tipo I no fue digerido por ninguna de las dos enzimas estudiadas. En el de las cepas pertenecientes al tipo II se observó la digestión del extremo 3' y no la digestión del extremo 5', y en el de las cepas pertenecientes al tipo III la digestión del extremo 5' y no la del extremo 3'.

El patrón de digestión obtenido mostró la pertenencia de la cepa RH al tipo I, las cepas Beverly y MC-49 al tipo II y la cepa C-56 al tipo III.

3.2. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS DE *Toxoplasma gondii* CIRCULANTES EN ESPAÑA.

3.2.1. Caracterización de cepas autóctonas procedentes de animales.

Se procedió a la caracterización genómica de cepas autóctonas siguiendo el procedimiento antes expuesto. Las cepas analizadas fueron las reseñadas en la tabla 31. Estas cepas fueron en su totalidad aislados de origen animal, 10 de ellas de óvidos y 1 de gato. Seis cepas procedentes de óvidos fueron obtenidas en el matadero a partir de musculatura de ovino, mayor de cuatro años. Las otras cuatro cepas procedieron de fetos de abortos de ovino. El mantenimiento de estas cepas se realizó, desde su aislamiento, por pases sucesivos a ratón.

En la caracterización se utilizó como muestra para la amplificación genómica el ADN extraído de los cerebros de ratones inoculados con las cepas autóctonas. Las muestras habían sido positivas previamente por PCR amplificando el gen B1.

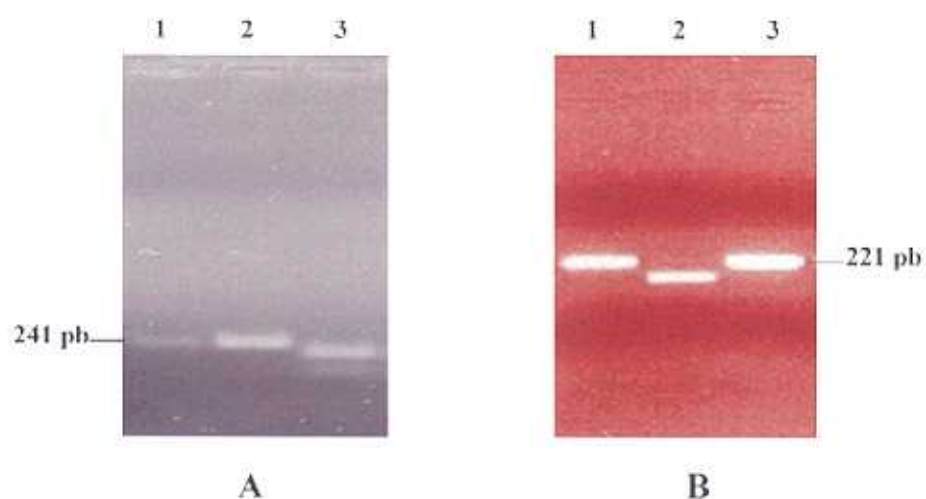


Figura 19. Análisis de restricción de los productos de amplificación de los extremos 5' y 3' del gen SAG2 de los genotipos I, II y III .

(A) Análisis de restricción con la enzima *Sau 3 AI* de los productos de amplificación del extremo 5'. Calle 1-3: Cepa RH (genotipo I), cepa Beverly (genotipo II) y cepa C-56 (genotipo III) respectivamente.

(B) Análisis de restricción con la enzima *Iha I* de los productos de amplificación del extremo 3'. Calle 1-3: Cepa RH (genotipo I), cepa Beverly (genotipo II) y cepa C-56 (genotipo III) respectivamente.

El patrón de digestión obtenido permitió agrupar a todos los aislados como genotipos I, II y III.

Tabla 31. Caracterización genómica de cepas autóctonas de origen animal

<i>Cepa</i>	<i>Origen de Aislamiento</i>	<i>Localidad de Aislamiento</i>	<i>Caracterización</i>		
			<i>SAG2-3'</i>	<i>SAG2-5'</i>	<i>Genotipo</i>
Ov-240	Músculo ovino	Zaragoza	ND	ND	I
Ov-89	Músculo ovino	Zaragoza	ND	ND	I
Ov-241	Músculo ovino	Zaragoza	ND	ND	I
Ov-246	Aborto ovino	Zaragoza	D	ND	II
Ov-236	Aborto ovino	Zaragoza	D	ND	II
Ov-239	Aborto ovino	Zaragoza	D	ND	II
Ov-86	Músculo ovino	Zaragoza	D	ND	II
Ov-235	Músculo ovino	Zaragoza	D	ND	II
Ov-80	Músculo ovino	Zaragoza	ND	D	III
Ov-74	Músculo ovino	Zaragoza	ND	D	III
868	Cerebro gato	Madrid	D	ND	II

D: digestión, ND: no digestión

Se observó que el 27.3% de las cepas autóctonas estudiadas pertenecían al genotipo I y el 18.2% al genotipo III mientras que el 54.5% fue caracterizado como genotipo II.

La cepa aislada del gato, hospedador definitivo de *T.gondii*, fue incluida dentro del genotipo II. Dentro de los aislados de óvidos, se encontró el 30% de las cepas pertenecientes al genotipo I, 20% al genotipo III y el 50% al genotipo II. Se destacó la inclusión dentro del genotipo II de las cepas que originaron abortos ovinos.

3.2.2. Caracterización de cepas procedentes de muestras clínicas humanas.

Con el fin de conocer la situación de las cepas de *Toxoplasma* que estaban originando enfermedad en el hombre en España, se procedió a la caracterización genómica de las cepas de *T. gondii* obtenidas de muestras de enfermos. Dada la dificultad en la obtención, aislamiento y mantenimiento de las cepas, se intentó la caracterización a

partir de muestras de enfermos que habían sido diagnosticadas como positivas por el método de amplificación genómica del gen B1.

Se procesaron quince muestras procedentes de catorce enfermos. Nueve pertenecían a ocho enfermos inmunodeprimidos VIH+, referidos como casos del nº 9 al nº16 en el apartado 1.2.3.1. De ellas, seis fueron líquidos cefalorraquídeos, una sangre y dos biopsias cerebrales procedentes del mismo paciente. De un enfermo inmunodeprimido pero VIH-, referido como caso nº6 en el apartado 1.2.3.2, se procesó una muestra de líquido cefalorraquídeo. De una gestante que presentó seroconversión en el embarazo, expuesto como caso nº5 en el apartado 2.2.1., se analizó una muestra de líquido amniótico. Las 4 muestras restantes analizadas procedieron de recién nacidos, referidos como casos nº9, nº11, nº13 y nº14 en el apartado 1.2.3.5. En este caso se procesaron dos sangres y dos líquidos cefalorraquídeos.

Nueve pacientes procedían de Madrid, dos de Barcelona y uno de León, Almería, Alicante y La Coruña.

Las muestras fueron sometidas al proceso de caracterización genómica por amplificación de los extremos 3' y 5' del gen SAG2 de *T.gondii* por PCR secuencial interna y posterior análisis del patrón de digestión de los productos amplificados. Se utilizaron como control para la amplificación y la digestión las muestras de las cepas RH, Beverly y C56.

De las quince muestras, en once (73.3%) se obtuvo la amplificación de los dos extremos del gen SAG2, en dos (13.3%) la de uno de los extremos y en otros dos no fueron amplificados ninguno de los dos extremos. En la tabla 32 se exponen los resultados obtenidos en los casos estudiados.

Tabla 32. Caracterización genómica de cepas autóctonas de origen humano

<i>Muestra</i>	<i>Caso</i>	<i>Origen</i>	<i>Sintomatología</i>	<i>Caracterización SAG2-3' SAG2-5' Tipo cepas</i>		
LCR	Nº 9-IVIH+	Madrid	Encefalitis, polirradiculitis	D	ND	II
LCR	Nº10-IVIH+	Madrid	Encefalitis	D	ND	II
LCR	Nº11-IVIH+	Madrid	Encefalitis, coroiditis, bronconeumonía	ND	D	III
LCR	Nº12-IVIH+	Madrid	Neuritis, parálisis facial	D	Sd	II *
LCR	Nº13-IVIH+	Madrid	Encefalitis	ND	ND	I
B.cerebral	Nº14-IVIH+	Barcelona	Nódulos cerebrales, convulsiones	ND	D	III
C.histol.cereb.	Nº14-IVIH+	Barcelona	Nódulos cerebrales, convulsiones	ND	D	III
LCR	Nº15-IVIH+	León	Afectación sistema nervioso central	ND	ND	I
Sangre	Nº16-IVIH+	Madrid	Fiebre, síntomas cerebrales	ND	D	III
LCR	Nº6-IVIH-	Almería	Síntomas neurológicos	ND	Sd	I / III*
L.Amniótico	Nº5-Gest.	Madrid	Asintomática	ND	ND	I
Sangre	Nº 13-RN	Madrid	Asintomático	ND	D	III
Sangre	Nº14-RN	Madrid	Coriorretinitis, calcificaciones craneales, dilatación ventricular	ND	ND	I
LCR	Nº 9-RN	Alicante	Microcefalia	Sd	Sd	-
LCR	Nº11-RN	La Coruña	Asintomático	Sd	Sd	-

IVIH+: Inmunodeprimido VIH+; IVIH-: inmunodeprimido VIH-; Gest: gestante; RN: recién nacido. Sd: sin datos; D: digerido; ND: no digerido; *genotipo sin confirmar

No se observó contaminación cruzada. Las dos muestras de cerebro procedentes del mismo paciente fueron procesadas por separado, observándose el mismo resultado.

El análisis de los resultados de las once muestras en las que se amplificaron los dos extremos mostró la caracterización de las diez cepas distintas obtenidas, con la inclusión de cuatro dentro del genotipo I, dos en el genotipo II y cuatro en el III.

En el estudio de los resultados obtenidos con las dos muestras en las que se amplificó uno de los extremos, el patrón de digestión obtenido en el extremo 3' hizo incluir a una de ellas dentro del genotipo II, mientras que la no digestión del extremo 3' obtenido en la segunda, permitió descartar su pertenencia al genotipo II, pudiendo ser incluida dentro de los tipos I o III.

Las posibles causas por las que dos muestras no pudieron ser amplificadas fueron la escasez de material con la que se contaba o la degradación del ADN durante el almacenaje a 4°C.

En resumen, de las doce cepas amplificadas, nueve procedentes de enfermos inmunodeprimidos, una de gestante y dos de recién nacidos, se encontraron cuatro (33%) pertenecientes al genotipo I, tres (25%) al II y cuatro (33%) al III y en una (8%) no se pudo confirmar su pertenencia al genotipo I o III (tabla 33).

Tabla 33. Genotipos de cepas autóctonas humanas.

<i>Cepas procedentes De Pacientes</i>	<i>Total cepas</i>	<i>Genotipo</i>		
		<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
Inmunodeprimidos VIH+	8	2	3	3
Inmunodeprimidos VIH-	1		No II	
Gestantes	1	1		
Neonatos	2	1		1
Total	12	4	3	4

No se encontró correlación aparente entre el genotipo de las cepas detectadas y los cuadros clínicos observados.

Si se tiene en cuenta sólo las cepas aisladas de sujetos VIH+ se observó que el 25% pertenecían al genotipo I, el 37.5% al II y el 37.5% al III. La cepa infectante en el caso del paciente inmunodeprimido VIH- se incluyó como posible genotipo I o III.

La cepa tipificada de la mujer embarazada fue de genotipo I.

Las cepas tipificadas en los casos congénitos fueron de los genotipos I y III. La del recién nacido asintomático fue de genotipo III mientras que la del caso con síntomas graves era del genotipo I.

Las nueve cepas tipificadas procedentes de Madrid fueron tres del tipo I, tres del tipo II y tres del tipo III. La cepa procedente de Barcelona fue del tipo III, la de León del tipo I y la de Almería de tipo I/III (tabla 34).

Tabla 34. Procedencia. Genotipo.

<i>Cepas procedentes De provincia</i>	<i>Total cepas</i>	<i>Genotipo</i>		
		<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
Madrid	9	3	3	3
Barcelona	1			1
León	1	1		
Almería	1		No II	
Total	12	4	3	4

En la figura 20 se expone la frecuencia encontrada de los tres genotipos en las cepas de origen animal y de origen humano, particularizando en el segundo grupo las procedentes de enfermos con SIDA y de los congénitos, incluyendo en este último la cepa aislada de líquido amniótico.

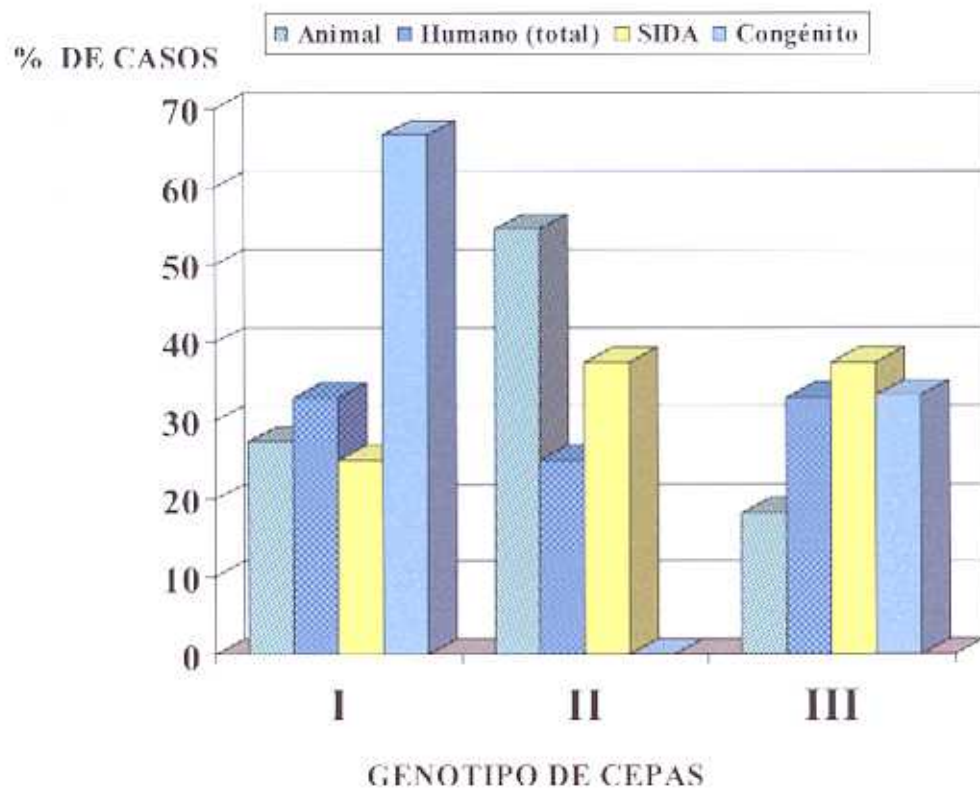


Figura 20. Frecuencia de los tres genotipos de *Toxoplasma gondii* observada en las cepas analizadas de origen animal y humano, particularizando en este último grupo los de SIDA y congénitos.

DISCUSIÓN

DISCUSION

1. APLICACIÓN DE LAS TECNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN DE *Toxoplasma gondii*.

1.1.ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN *IN VITRO* DEL ADN DE *Toxoplasma gondii*.

El diagnóstico de la infección por *Toxoplasma gondii* es complejo y generalmente se basa en pruebas serológicas y de aislamiento del parásito, pero éstas presentan problemas de sensibilidad y especificidad, por lo que la utilización de las técnicas de biología molecular están siendo valoradas en la actualidad. En nuestro estudio se eligió la aplicación de la PCR para la detección del genoma del parásito por ser una técnica muy específica y sensible, además de reproducible y aplicable a diferentes tipos de muestras clínicas.

La técnica de PCR está siendo empleada utilizando la amplificación de diferentes secuencias diana del ADN del parásito. En el presente estudio fue seleccionada una secuencia del gen B1 pues, aunque su función es desconocida, está bien caracterizado y es altamente específico y conservado en las diversas cepas de *T.gondii* analizadas. Se encuentra repetido al menos 35 veces en el genoma del parásito (Burg y col., 1989) y esto permite una mayor sensibilidad como se ha demostrado en estudios comparativos con otros genes del parásito (Wastling y col., 1993, Verhofstede y col., 1993). La estandarización de la técnica consiguió una optimización adecuada y resultados reproducibles.

En nuestro estudio se comparó la sensibilidad y especificidad obtenidas con la realización de la técnica PCR simple, tras la realización de la PCR e hibridación posterior con sonda específica, y la amplificación por PCR secuencial interna o *nested*. La sensibilidad obtenida con la PCR simple fue de 10 pg de ADN purificado de *Toxoplasma gondii*, con la PCR e hibridación fue de 1 pg y con la PCR interna de 100 fg, que equivale al ADN de 50, 5 y 0,5 parásitos respectivamente (Hitt y Filice, 1992). Esta sensibilidad fue confirmada con muestras de ADN humano inoculadas con taquizoítos, similares a las muestras clínicas a estudio, para observar la reproducibilidad en presencia de ADN extraño, obteniéndose una sensibilidad de 100 taquizoítos con la

PCR simple y entre uno y cuatro con la PCR interna. Este último resultado se expresa de esta forma ya que el método utilizado para el recuento y dilución de la suspensión de taquizoítos no garantiza la presencia precisa de uno, dos, tres o cuatro parásitos igual que lo expuesto en el estudio de Joss y Ho-Yen (1997). La sensibilidad fue similar a la reportada por Joss y col., (1993) en las pruebas realizadas sin ADN extraño, pero en nuestro estudio se consiguió una mayor sensibilidad con ADN contaminante que la encontrada por estos autores, siendo similar a la encontrada por Burg y col., (1989); Savva y col. (1990), Hitt y Filice (1992), Wastling y col., (1993), Lavrad y col., (1995); Rodríguez y col., (1997) en preparaciones similares realizando PCR e hibridación con sonda específica.

Se comprobó, al igual que se señala en otros estudios (Guay y col., 1993), que el exceso de ADN inhibe la reacción. Burg y col., (1989) observaron que 1 µg de ADN extraño puede tener un efecto 50 veces inhibitorio en la amplificación de un bajo número de secuencias diana.

En la PCR simple, aunque es más sencilla y reduce los riesgos de contaminación, se encontró que el producto de amplificación obtenido debía ser confirmado, con la hibridación con una sonda específica o desarrollando una segunda PCR con oligos internos, para asegurar la especificidad. Esto sucede en la mayoría de las PCR simples utilizadas en diferentes aplicaciones, siendo necesaria la confirmación del resultado obtenido, según lo expuesto por diferentes autores (Erllich y col., 1991; Monis y Andrews, 1998).

Con las técnicas de PCR-hibridación y con la PCR secuencial interna no se observaron reacciones cruzadas con otros patógenos que pueden estar presentes ni con el ADN humano.

El proceso de PCR-hibridación requiere más tiempo y es más complejo por lo que la utilización de la PCR secuencial interna ofrece las ventajas de conseguir igual o mayor sensibilidad y especificidad con un proceso más sencillo.

La alta especificidad y sensibilidad encontrada con la PCR secuencial interna, tanto en muestras experimentales como en muestras clínicas, permite destacar esta técnica como de elección en el desarrollo del diagnóstico por PCR, aunque hay que señalar las desventajas de presentar un mayor coste del proceso y peligro de contaminación cruzada debido a la manipulación de los productos de amplificación. Esto requiere un

rigor en las medidas a realizar en el laboratorio para evitar resultados falsos positivos como los descritos en diversos estudios (Grob y col., 1992; Guy y col., 1996; Joss y Ho-Yen, 1997), sobretodo cuando se procesa un elevado número de muestras. Esta posibilidad nos llevó a adoptar unas medidas exigentes para evitar la contaminación (Kwok y Higuchi, 1989; Kwok, 1990), que en nuestro caso se han mostrado efectivas.

La coamplificación con un control positivo interno es de gran importancia para la detección de inhibidores en las muestras clínicas, por lo que la adaptación de un juego de oligos que amplifican el gen de la β -globina presente en los diferentes tipos de muestras humanas, en el desarrollo de la técnica PCR secuencial interna, supuso un control positivo interno de gran utilidad (Saiki y col., 1985; Bauer y col., 1991). El control interno es imprescindible para descartar los falsos negativos, ya que si no se produce la amplificación se puede asumir que el material utilizado no contiene ADN o contiene productos inhibidores de la reacción.

Se han enunciado un gran número de inhibidores asociados con el alto nivel de ADN residual inespecífico, sangre, hemoglobina, urea, glicerol y componentes inidentificados que pueden estar en cualquier muestra clínica (Erich, 1989; Guay y col., 1993; Hit y Filice, 1992). En algunos estudios se han evaluado los inhibidores endógenos realizando una amplificación paralela con una alícuota de la muestra a la que se le añadía una cantidad determinada de ADN de *T.gondii* (Joss y Ho-Yen, 1997), pero esto supone duplicar el número de reacciones de amplificación y, lo que es más importante, aumentar considerablemente el riesgo de contaminación cruzada de las muestras o la posibilidad de fallo mecánico y contaminación aleatoria de las muestras que no deberían estar inoculadas. En otros estudios (Bretagne y col, 1993; Jenum y col., 1998; Forestier y col., 1998), se ha utilizado como control positivo interno la coamplificación de una secuencia o fragmento de otro tipo de ADN añadido a la muestra, pero tiene la desventaja de representar un paso más en el proceso y la posibilidad de fallo en la inoculación de la muestra que supondría considerar como inhibida una muestra realmente negativa. En nuestro estudio se observó que la coamplificación del control interno y de la secuencia diana de *T.gondii* no supuso pérdida en la sensibilidad de la técnica.

1.2. APLICACIÓN DE LA PCR EN LA DETECCIÓN DEL ADN DE *Toxoplasma gondii* EN MUESTRAS CLÍNICAS.

Determinación de los métodos de procesamiento y extracción de ADN de los diversos tipos de muestras biológicas.

La elección del tratamiento de las distintas muestras a seguir en nuestro estudio nos llevó a seleccionar el método que proporcionara una muestra útil para la amplificación, intentando simplificar el número de pasos del proceso para evitar contaminaciones y posibles pérdidas de ADN.

Las muestras que contienen células se digieren con proteinasa K para, posteriormente, proceder a la extracción con solventes orgánicos (Sambrook y col., 1989); pero esta extracción tiene el riesgo de perder ADN del patógeno que esté en pequeña cantidad (Joss y col., 1993). En nuestro estudio la capacidad de detectar de uno a cuatro parásitos en presencia de ADN humano con la digestión con tampón con detergente y proteinasa K y posterior hervido supone que no es necesario usar otros procesos de extracción más complicados, de acuerdo con lo observado por Grob y col. (1992) y Ostergaard y col (1993). Este proceso requiere sólo un paso para añadir el tampón con la enzima, por lo que se disminuye el riesgo de contaminación de la muestra ocasionando falsos positivos. De igual forma al comparar los resultados obtenidos con una extracción cruda por ebullición con agua y tras el tratamiento con detergentes y proteinasa K, se observó una mayor sensibilidad con este último método. Por esto fue elegido para el procesamiento de las diferentes muestras excepto las de sangre completa y las conservadas en parafina y formol. Estas últimas conllevaron la utilización de otros métodos para evitar la presencia de inhibidores inespecíficos con mayor riesgo de estar presentes en este tipo de muestras.

Ya que los resultados obtenidos con la digestión con proteinasa K en el procesamiento de las muestras de sangre completa no fueron buenos, se procesó con un equipo de extracción comercial (Wizard genomic, Promega); y por otra parte se obtuvieron las células nucleadas mediante un gradiente de densidad, para eliminar los eritrocitos, y posterior extracción con proteinasa K. Con el segundo método existe el problema que en el caso de haber taquizoítos extracelulares, se depositan en la misma fase que los eritrocitos y no son recuperados (Hitt y Filice, 1992), además de que este proceso es más largo y pueden quedar más restos de inhibidores que en el proceso de extracción comercial; por ello se consideró este último método de elección para estas muestras.

Igualmente, en las muestras formoladas o parafinadas se consiguió una mejor extracción con las resinas de intercambio iónico debido a la mejor eliminación de inhibidores.

La técnica de PCR secuencial interna permitió la detección de ADN de *T.gondii* de todas las cepas analizadas, confirmando la conservación del gen B1 en los diferentes genotipos, igual que observaron diversos autores en sus aislados (Burg y col., 1989; Ostergaard y col., 1993) por lo que la utilización de una secuencia diana específica, pero común a las diferentes cepas, es considerada de gran utilidad para el diagnóstico. Se confirmó su aplicación en los diferentes tipos de muestras, aunque algunas de corazón presentaron inhibiciones repetidas, seguramente debidas a la presencia de hemoglobina, por lo que no se considera una muestra idónea para la realización sistemática de la PCR a no ser realizada tras procesos de extracción más complejos.

Detección de ADN de diversas cepas de *Toxoplasma gondii* por PCR en muestras de ratones parasitados.

Los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad de la técnica en el ensayo controlado en ratones utilizando la prueba de IFI como patrón, mostraron unos altos valores de especificidad y sensibilidad (100% y 93% respectivamente) cuando la muestra está parasitada. Aunque este experimento sólo presenta un valor parcial al estar controlado y la muestra investigada (cerebro) está generalmente parasitada debido a la preferencia de *Toxoplasma* por este tejido, nos sirvió para confirmar la utilidad de la PCR cuando se procesa una muestra naturalmente infectada y la detección de diferentes cepas, aunque es necesario realizar nuevos estudios comparativos con un número significativo de muestras clínicas procedentes de enfermos.

Detección del ADN de *Toxoplasma gondii* por PCR en muestras clínicas para el diagnóstico de la toxoplasmosis humana.

Las muestras deben procesarse lo antes posible tras la obtención pues la lisis de los parásitos y la degradación del ADN durante el almacenamiento pueden tener influencia en el resultado (Ostergaard y col., 1993; Joss y Ho-Yen, 1997). Sin embargo, la posibilidad de detección por esta técnica en diversas condiciones de almacenaje es mayor que por las técnicas de aislamiento en cultivos celulares y ratón (James y col., 1996).

Los resultados obtenidos demuestran que en determinados pacientes la PCR puede ser superior a los métodos convencionales, especialmente en pacientes con SIDA y en congénitos, de acuerdo a lo expuesto por diversos autores como Grob y col, (1992), pudiendo ser una útil herramienta adicional para el diagnóstico de la toxoplasmosis. La posibilidad de controlar la presencia de taquizoítos en sangre periférica puede ser usada en la detección de toxoplasmosis reactivadas asociadas con disfunciones inmunes, y la capacidad de monitorizar la cinética del parásito en fluidos corporales, como linfa o sangre, sugiere que la PCR puede proveer una válida herramienta experimental para el estudio de la patogénesis de la toxoplasmosis en modelos animales y en el hombre (Wastling y col., 1993). Asimismo, esta técnica puede reemplazar al aislamiento para la detección directa del parásito, evitando el uso de un gran número de animales.

La detección de ácidos nucleicos no se ve afectada por las disfunciones del sistema inmune del hospedador, produce resultados más rápidos que las técnicas de aislamiento y puede detectar *Toxoplasmas* no viables o fragmentos del parásito. Estos últimos pueden no significar necesariamente enfermedad y hay que admitir que la variación de la sensibilidad en varios ensayos y la posibilidad de una distribución del parásito no uniforme en los especímenes clínicos puede también originar resultados discordantes y la valoración de falsos positivos y negativos (Johnson y col., 1993).

En nuestro estudio la prueba de PCR seriada interna fue utilizada para la detección de ADN de *Toxoplasma* en diferentes tipos de muestras procedentes de enfermos, pertenecientes a los principales grupos de riesgo, cuya sintomatología podría ser compatible con la toxoplasmosis. Dada la variedad de síntomas y órganos que pueden verse involucrados en ella (Ho-Yen, 1992) fueron estudiadas tanto muestras de tejidos como de fluidos corporales de diferentes características. Se observó que, con el método elegido, todo tipo de muestra pudo ser procesado para la amplificación aunque algunas presentaron inhibidores inespecíficos. Sólo se detectó un 8% de inhibiciones y no se realizó una reextracción de estas muestras para evitar una posible contaminación, prefiriendo no determinar un resultado a presentar falsos positivos.

Las muestras que mostraron un mayor porcentaje de inhibición fueron las de placenta, cerebro, fijado en formol, lavado broncoalveolar y líquido amniótico. Todas ellas son muestras ricas en células y susceptibles de presentar diferentes inhibidores inespecíficos (Chuchana, 1992; Singh, 1997) pero la amplificación obtenida en la mayoría de las muestras nos indica que pueden ser empleadas en el diagnóstico

molecular. Como alternativa, la utilización de un método de extracción más elaborado para las muestras de placenta, cerebro y lavado broncoalveolar, mejoraría el rendimiento de la técnica. En cambio, de acuerdo con lo expuesto por Hohlfeld y col. (1994), no consideramos que se deba utilizar un método más complejo en la extracción de las muestras de líquido amniótico pues conlleva la realización de un mayor número de pasos con posibilidad de contaminación, con graves consecuencias que pueden llevar hasta interrumpir la gestación.

1.2.1. Pacientes inmunodeprimidos VIH+

La gran mayoría (72%) de los pacientes seguidos de este grupo de riesgo en nuestro estudio presentaban síntomas neurológicos compatibles con TE, aunque el cuadro es similar al observado en otras afecciones encefálicas (Ho-Yen, 1992; Antiróni y col., 1997). Actualmente la causa más común de lesiones cerebrales focalizadas en estos pacientes es la toxoplasmosis, pero el uso de profilaxis primaria anti-*Toxoplasma* y el tratamiento antirretroviral de elevada eficacia puede impedir que se reactive la enfermedad, logrando reducir los casos de TE (Ribera Pascuet, y col., 1998; Chaisson y col., 1998). Se observa una mayor prevalencia de otras patologías, como los casos de linfoma primario del sistema nervioso central y linfomas no-Hodgkin, debido al incremento de la supervivencia de los pacientes con SIDA (Antiróni y col., 1997). No obstante la toxoplasmosis causa el 70-90% de las lesiones focales cerebrales en los pacientes que no reciben profilaxis y el 20-50% en los que si la reciben (Ribera Pascuet y col., 1998). En estudios recientes parece observarse que el incremento de la supervivencia de los enfermos VIH+ con toxoplasmosis latente no está asociado con un incremento en la incidencia de la TE; sin embargo, la supervivencia prolongada de los pacientes con SIDA puede incrementar el riesgo de adquirir una infección primaria, aunque éste no es mayor que en la población normal (Reiter-Owona, 1998).

La toxoplasmosis primaria no origina síntomas clínicos en los pacientes VIH+ con inmunosupresión moderada, en los que puede existir una respuesta humoral similar a los pacientes VIH- (Reiter-Owona, 1998), pero en pacientes con SIDA severamente inmunodeprimidos se ha observado la ausencia de respuesta de anticuerpos indicativa de infección aguda por *T.gondii* (Luft y col., 1984; Garly y col., 1997).

En pacientes inmunocomprometidos el diagnóstico de TE es muy complejo y los métodos serológicos no son concluyentes, pues los anticuerpos IgM e IgA son negativos

en más del 80% de los casos (Zufferey y col., 1993; Rodríguez y col., 1997) y, además, su positividad no indica necesariamente una toxoplasmosis activa (Pinon y col., 1995). Asimismo, la detección de IgG tiene un valor limitado, aunque su presencia puede tener cierto valor predictivo pues está presente en el 95% de los pacientes con TE, pero también en más del 50% de los pacientes con otras enfermedades (Ribera Pascuet y col., 1998).

Por todo esto diversos autores han considerado interesante la utilización de la técnica PCR para el diagnóstico de la TE (Caramello y col., 1993; Ostergaard y col., 1993; Novati y col., 1994; Rodríguez y col., 1997) aunque Robert y col (1996) consideran que añade poco a su diagnóstico; pero puede ser de ayuda en el diagnóstico de TE asociada a reactivaciones extracerebrales y en la toxoplasmosis diseminada. Los estudios realizados por Dupouy-Camet y col., (1993), Filice y col., (1993), Dupon y col., 1995 y Pelloux y col., (1997) demostraron una mayor sensibilidad con esta técnica que la hallada en el aislamiento en cultivos celulares o animales de experimentación.

De los enfermos analizados en nuestro estudio se detectaron por PCR 17 casos con toxoplasmosis activa, de los cuales 14 (82%) mostraron síntomas de TE, uno (6%) alteración cardíaca, uno pulmonar y uno síntomas gripales y fiebre. Las muestras analizadas fueron principalmente LCR (68%) seguidas por sangre (14%) y otras como orina, lavado broncoalveolar y biopsias.

En diez pacientes con TE la PCR fue positiva en LCR, no pudiendo obtenerse esta muestra en los otros cuatro pacientes. La detección por PCR del parásito en LCR en pacientes con SIDA y TE ha sido evaluada presentando una sensibilidad variable, entre el 30-100% según los distintos estudios (Verhofstede y col., 1993; Schoondermark y col., 1993; Novati y col., 1994; Ostergaard y col., 1993; Cingolani y col., 1996; Rodríguez y col., 1997; Antinori y col., 1997). La mayoría de los autores consideran de gran utilidad esta técnica dada la alta especificidad demostrada aunque otros la consideran de un valor diagnóstico limitado (Eggers y col., 1995). Nuestros resultados confirman la utilidad de la prueba, pero coincidimos con otros autores en señalar que no siempre puede ser tomada la muestra de LCR pues, en aquellos pacientes con lesiones cerebrales asociadas a signos de hipertensión intracraneal, existe riesgo de hernia cerebral y las punciones lumbares deben ser evitadas (Antinori y col., 1997).

En dos casos de TE se detectó el ADN del parásito en sangre. Uno de ellos presentaba además una miocarditis, entre otros síntomas, por lo que se consideró una

toxoplasmosis diseminada. En el diagnóstico de TE mediante PCR en muestras de sangre, se ha observado diferente sensibilidad según los estudios realizados, encontrándose entre el 20-30% en los estudios con un mayor número de pacientes y una especificidad del 100% (Dupon y col., 1995; Robert y col., 1996; Franzen y col., 1997; Pelloux y col., 1997); los resultados obtenidos indican la posibilidad de parasitemias transitorias e intermitentes (Filice y col., 1993). Se considera que la mayoría de los casos de TE resultan de la reactivación local de quistes cerebrales latentes, por lo que la parasitemia no siempre se produce de manera permanente, siendo de mayor utilidad la detección de *T.gondii* en sangre por PCR en casos asociados a una infección cerebral severa, extracerebral o diseminada (Khalifa y col., 1994; Robert y col., 1996), como los casos expuestos de nuestro estudio. Así, la parasitemia transitoria se confirmó en el caso nº5, en el que la TE se diagnosticó detectando el parásito en muestra de orina y en cambio no apareció en muestra de sangre. Este ejemplo apoya la utilidad de las muestras de orina en el diagnóstico de toxoplasmosis activa, observada por nosotros en el estudio de casos congénitos (Fuentes y col., 1996).

La técnica PCR nos permite demostrar la presencia de ADN de *Toxoplasma gondii* en diferentes muestras y aunque la sensibilidad es variable para el diagnóstico de TE y otras presentaciones en individuos inmunodeprimidos, ésta puede incrementarse combinando el estudio de LCR con otras muestras biológicas (sangre, lavado broncoalveolar, orina, tejidos). Nuestros resultados coinciden con otros estudios realizados en los que analizan muestras de sangre y LCR; en estos pacientes se constata un incremento de la detección de toxoplasmosis activa al analizar ambos tipos de muestras (Dupon y col., 1995; Foudrinier y col., 1996). También consideramos que el análisis de muestras sucesivas consigue una mayor probabilidad de detección del parásito, incrementando la sensibilidad. Asimismo hay que tener en cuenta que la instauración de la terapia anti-*Toxoplasma* afecta a la sensibilidad de la detección; por lo que la obtención de la muestra antes o a lo largo de la primera semana tras la instauración del tratamiento mejora la sensibilidad del ensayo (Novati y col., 1994; Cingolani y col., 1996; Monforte y col., 1997).

En nuestro trabajo se determinó la PCR como una técnica útil para la confirmación de diagnósticos presuntivos realizados en anatomía patológica con muestras parafinadas. Este tipo de muestra puede presentar mayor posibilidad de inhibición, pero aplicando un método de extracción específico permite la realización de la amplificación. Estas

muestras pueden ser importantes para la confirmación retrospectiva de algunos casos diagnosticados por otras técnicas.

Los enfermos de toxoplasmosis no encefálica detectados en nuestro estudio (casos 1, 6 y 17) presentaron fiebre, síntomas gripales, afectación cardíaca o pulmonar según los diferentes casos. La toxoplasmosis diseminada y pulmonar en pacientes con SIDA exige una mayor atención por el incremento de casos, en muchas ocasiones mal diagnosticados, para lo que la aplicación de la PCR en muestras de lavado broncoalveolar (Roth y col., 1992; Bretagne y col., 1993; Bretagne y col., 1995), biopsias y sangre (Filice y col., 1993; Liesenfeld y col., 1994; Blanche y col., 1994; Dupouy-Camet y col., 1993) se ha revelado como una técnica muy útil, mejorando el diagnóstico de estas presentaciones. Sin embargo, para Lavrard y col., la sensibilidad de la PCR en muestras de lavado broncoalveolar es similar a la tinción con Giemsa y aislamiento en cultivos celulares (Lavrard y col., 1995). En nuestro estudio la aplicación de la PCR en muestras de lavado broncoalveolar, sangre, orina y biopsia cardíaca permitieron la detección de los casos anteriormente expuestos.

Todos los casos de nuestro estudio en los que se realizó la serología, menos uno, presentaron anticuerpos IgG específicos, no detectándose otro tipo de anticuerpos. Esto viene a confirmar lo observado por diferentes autores (Antinori y col., 1997; Garly y col., 1997; Reiter-Owona y col., 1998) que afirman que la toxoplasmosis en los enfermos de SIDA está predominantemente causada por la reactivación del parásito y que los resultados serológicos no ayudan a la determinación del diagnóstico. No obstante, no hay que descartar la sospecha de toxoplasmosis con serología negativa ya que se puede pensar en una infección primaria aguda, como ocurrió en el enfermo nº1.

En resumen, la PCR supone una ayuda interesante para el diagnóstico de TE y otras presentaciones, pues un resultado positivo confirma el diagnóstico, aunque uno negativo no lo excluye (Ribera Pascuet y col., 1998), también es interesante en la monitorización de los tratamientos específicos instaurados (Dupouy-Camet y col., 1993). La alta especificidad de la técnica puede ayudar a diferenciar entre toxoplasmosis cerebral y otras enfermedades cerebrales (Franzen y col., 1997).

1.2.2. Pacientes inmunodeprimidos VIH negativos.

La mayoría (57%) de los pacientes seguidos de este grupo de riesgo presentó síntomas neumónicos y el 25% neurológicos.

Aunque la toxoplasmosis es bien reconocida como una infección oportunista en diversas poblaciones de pacientes inmunocomprometidos (Hakes y Armstrong, 1983; Arnold y col., 1997; Siegel y col., 1971; Ho-Yen y col., 1992), es en individuos VIH+ en los que se considera de mayor importancia. Actualmente se está valorando el incremento del riesgo de toxoplasmosis cerebral y diseminada en enfermos con diversas patologías con inmunosupresión, como se observa en las revisiones realizadas sobre transplantados de médula (Peacock y col., 1995; Bretagne y col., 1995; Brinkman y col., 1998).

En revisiones realizadas de toxoplasmosis en inmunodeprimidos VIH- se ha observado que el diagnóstico es frecuentemente hecho postmortem, sin que los pacientes recibieran terapia específica (Ho-Yen, 1992; Arnold y col., 1997).

En individuos transplantados la toxoplasmosis se adquiere por la transmisión de *T.gondii* con el órgano transplantado o por la reactivación de una infección anterior debida a la inmunosupresión (Peacock y col., 1995; Yadlapati y col., 1997). En el estudio de Gallino y col., (1996) se observó que los transplantados cardíacos tienen mayor frecuencia y gravedad de toxoplasmosis asociada a la infección transmitida por los órganos donantes que por la reactivación de una infección latente.

Lumbreras y col.,(1997), en su revisión sobre la prevención de la infección en inmunodeprimidos, recomienda mantener la profilaxis durante 6 meses ya que es el periodo considerado de mayor riesgo de presentación de toxoplasmosis tras trasplante o quimioterapia (Lappalainen y col., 1998). Otros autores (Bretagne y col.1995; Brinkman y col., 1998) han observado que la toxoplasmosis puede ocurrir hasta 12 meses después.

En algunos casos de reactivación se observa una seroconversión o incremento de título de los anticuerpos específicos (Blanc-Jouvan y col., 1996; Lappalainen y col., 1998) pero en otros (Bretagne y col., 1995) los niveles de IgG, IgA e IgM se mantienen en los rangos normales, no manifestando cambios significativos. En otros casos la serología negativa persiste a pesar de la toxoplasmosis activa, siendo el único diagnóstico

definitivo la presencia de taquizoítos en las diferentes muestras (Geissmann y col., 1994; Chandrasekar y Momin, 1997).

En todos estos casos un tratamiento temprano es muy importante (Cuturic y col., 1997). Hay que resaltar la utilidad de la PCR para un diagnóstico rápido y específico de toxoplasmosis cuando el examen rutinario es negativo, siendo interesante realizarla en aquellos casos de fiebre o síntomas inespecíficos de origen desconocido.

De los pacientes analizados en nuestro estudio se detectaron seis casos con toxoplasmosis activa, siendo cuatro enfermos con terapia antitumoral y uno transplantado. De estos pacientes, cinco (83%) presentaron síntomas neumónicos y uno (17%) neurológicos, no considerándose en principio la posibilidad de una toxoplasmosis por el médico remitente. Los casos reportados de toxoplasmosis diseminada tras transplante hepático presentan como primeras manifestaciones fiebre y neumonía, y después fallo multiorgánico (Lappalainen y col., 1998). Ya que el pulmón está comúnmente involucrado en la toxoplasmosis diseminada, sobretudo en inmunodeprimidos, es conveniente el análisis del lavado broncoalveolar por la técnica PCR para intentar un pronto diagnóstico, como observamos en nuestro estudio y de acuerdo a otros autores (Bretagne y col., 1995; Lappalainen y col., 1998). En uno de los casos con neumonía, la PCR detectó el parásito en sangre demostrando una parasitemia activa en ese momento, aunque no fue positiva en orina. En el caso de toxoplasmosis encefálica el parásito se detectó en LCR.

El paciente nº 5, sometido a quimioterapia, no presentó serología positiva por lo que se descartó una reactivación, pero la presencia del parásito en dos muestras sucesivas de lavado broncoalveolar y en una de LCR indicó una primoinfección adquirida, no sospechada y sólo detectada por la técnica PCR. El resto de pacientes presentó anticuerpos IgG específicos, indicadores de una posible reactivación de la infección. En nuestro estudio, igual que para otros autores, la técnica PCR ha sido considerada de utilidad en la detección del parásito en diferentes tipos de inmunodepresión no-SIDA (Van de Ven y col., 1991; Johnson y col., 1993; Blanc-Jouvan y col., 1996; Yadlapati y col., 1997; Khoury y col., 1999).

1.2.3. Pacientes inmunocompetentes.

El diagnóstico de la toxoplasmosis en individuos inmunocompetentes, excluyendo gestantes y neonatos de los que se hablará posteriormente, puede ser menos complejo y suele basarse en métodos serológicos, pero la persistencia de IgM en individuos con infección crónica y otros aspectos pueden llevar a confusión.

En nuestro estudio se detectó el parásito por PCR en el lavado broncoalveolar de un paciente considerado inmunocompetente, pero que presentó una rápida y fatal evolución. La presencia de IgG específicas y no de IgM e IgA podría indicar, más que una primoinfección, una reactivación debida a una posible inmunodepresión quizás originada por otros agentes infecciosos o cualquier otra causa no determinada.

La técnica de PCR permitió en nuestro estudio el diagnóstico de una toxoplasmosis ocular. De Boer y col., (1996), en un estudio realizado por análisis serológico y PCR del humor vítreo de pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes con uveítis, observaron la detección por PCR del 31% (4/13) de uveítis toxoplásmicas en pacientes inmunocompetentes, en los que también hubo producción local de anticuerpos específicos; mientras que se detectó el 37% (3/8) en pacientes inmunodeprimidos presentando anticuerpos sólo en un caso. Así, estos autores recomiendan la técnica de PCR en el diagnóstico de uveítis toxoplásmica en pacientes inmunodeprimidos y la combinación de técnicas en inmunocompetentes. Otros estudios han permitido la detección de *T.gondii* por PCR en humor vítreo en la coriorretinitis originada tras trasplante hepático (Blanc-Jouvan y col., 1996).

El análisis de humor vítreo para detectar la producción local de anticuerpos puede establecer la causa de la uveítis, pero puede observarse falsos negativos si la muestra es recogida en fase temprana o tardía de la enfermedad o si hay destrucción masiva de la coroides (Ronday y col., 1995), por lo que la PCR se muestra como una técnica interesante en combinación con las serológicas.

1.2.4. Mujeres embarazadas

La primoinfección contraída durante la gestación es generalmente asintomática y, en ausencia de control prenatal, es raramente detectada a lo largo del embarazo. El

diagnóstico se basa tradicionalmente en pruebas serológica, pero la persistencia de IgM e IgA en muchos casos no permite determinar si la infección fue antes o durante la gestación, por lo que la realización de la técnica PCR para la detección del parásito se presenta como una prueba interesante. Aunque la aplicación de la PCR tanto en gestantes como en recién nacidos también se valora en el punto 2.4.2.1. de la discusión, reseñamos lo siguiente.

En nuestro estudio se analizaron principalmente muestras de sangre, orina y líquido amniótico. Se consideró la investigación de las muestras de sangre y orina para intentar detectar la presencia del parásito en una fase activa en unas muestras sencillas de tomar durante la gestación. Los resultados obtenidos con las muestras de sangre indicaron que, de acuerdo a lo observado en otros estudios (Guy y Joynson, 1995; Frazen y col., 1997), la parasitemia es transitoria y desaparece rápidamente en las personas inmunocompetentes. Así pues, aunque un resultado positivo indica toxoplasmosis aguda, como se confirmó en la muestra positiva de nuestro estudio, los negativos no descartan una infección activa, por lo que debe ser apoyada con otros estudios complementarios.

No se detectó el parásito en ninguna muestra de orina analizada, indicando que, igual que sucede con la parasitemia, la emisión es transitoria y no se mantiene durante tiempo prolongado.

La PCR en líquido amniótico se presenta como una herramienta interesante para el diagnóstico de la toxoplasmosis prenatal. Las pruebas convencionales usadas incluyen la inoculación de sangre fetal y líquido amniótico en ratón, la detección de IgM específicas en sangre fetal y el examen del cerebro por ultrasonidos. Dada la proporción de falsos negativos en estos diagnósticos, el riesgo asociado a la toma de muestra de sangre fetal y la tardanza en tener unos resultados definitivos (Daffos y col., 1988), se ha considerado de gran interés la detección de *T.gondii* por PCR en líquido amniótico (Grover y col., 1990; Cazenave y col., 1991; Hohlfeld y col., 1994; Berrebi y Kobuch 1994; Forestier y col., 1998; Jenum y col., 1998). La tasa de transmisión al feto varía según el trimestre de gestación (Chatterton, 1992) refiriendo un riesgo global de infección fetal del 40% (Lappalainen y col., 1992; McAuley y col., 1994; Allain y col., 1998). Tanto para iniciar el tratamiento adecuado de la madre como para conocer la posible transmisión trasplacentaria y afectación fetal, es necesario el diagnóstico prenatal.

La sensibilidad de la técnica PCR en la detección de la toxoplasmosis congénita en líquido amniótico varía en diferentes estudios entre un 97,4% y un 59%, presentando siempre una especificidad alta (94-100%) (Grover y col., 1990; Dupoy-Camet y col., 1993; Cazenave y col., 1991; Hohlfeld y col., 1994; Forestier y col., 1998; Jenum y col., 1998).

En la toma de la muestra de líquido amniótico hay que considerar el riesgo de aborto espontáneo que se tiene al hacer una amniocentesis, pero éste es menor que el esperado en la cordocentesis y los resultados obtenidos con líquido amniótico son iguales o mejores que con esta última técnica (Hohlfeld y col., 1994; Forestier y col., 1998). Hohlfeld y col., (1994) consideran en su estudio que la toma de líquido amniótico debe hacerse al menos cuatro semanas después de la infección aguda de la madre, por la posibilidad de falsos negativos al inicio de la infección fetal.

En nuestro estudio se pudo comprobar la transmisión transplacentaria en el caso de dos embarazadas que presentaron una primoinfección en el primer y segundo trimestre de gestación respectivamente, confirmando la utilidad de la PCR en líquido amniótico para un diagnóstico prenatal rápido de acuerdo a los estudios citados.

1.2.5. Recién nacidos

La toxoplasmosis congénita puede ocasionar una sintomatología variada pero la mayoría de los casos son asintomáticos al nacer, apareciendo en los años posteriores las lesiones (McAuley y col., 1994; Lynfield y Eaton, 1995).

El diagnóstico postnatal se presenta complejo ya que la serología en muchos casos no es concluyente, por lo que en nuestro estudio se realizó la detección de *T.gondii* por PCR en muestras de sangre, orina y LCR. Hay que destacar que, aunque hay diversos estudios de diagnóstico prenatal de toxoplasmosis congénita por PCR (Grover y col., 1990; Dupoy-Camet y col., 1992; Cazenave y col., 1991; Hohlfeld y col., 1994; Forestier y col., 1998; Jenum y col., 1998) son muy pocos en los que se emplea en el diagnóstico postnatal (Fuentes y col., 1996). El diagnóstico clínico no determina la posibilidad de toxoplasmosis pues la sintomatología no es patognomónica y en gran proporción son asintomáticos al nacer (Hall, 1992; Waleska y col., 1993; Lynfield y Eaton, 1995). En

nuestro estudio los casos de toxoplasmosis detectados fueron asintomáticos en el 43% (6/14) y el 57% (8/14) sintomáticos.

El diagnóstico de la toxoplasmosis congénita se suele basar en la demostración serológica de IgM o IgA específicas, pero se ha comprobado que estos anticuerpos frecuentemente no se presentan en los recién nacidos (Desmonts y col., 1985; McAuley y col., 1994; Foudrinier y col., 1995). De acuerdo a lo informado por estos autores, hay que destacar que en nuestro estudio sólo dos (14%) casos detectados por PCR, uno sintomático y otro asintomático, mostraron anticuerpos IgM específicos, uno de los cuales también presentó IgA, mientras que los doce (86%) casos restantes sólo presentaron anticuerpos IgG residuales maternos. En estos últimos sólo se confirmaría la toxoplasmosis congénita tras comprobar la persistencia de IgG durante más de un año de seguimiento. La técnica PCR realizada permitió, en estos casos, detectar de forma rápida y específica la infección del recién nacido, instaurándose un tratamiento precoz para evitar graves consecuencias posteriores en los niños asintomáticos, como se señala en diferentes estudios (Hohlfed y col., 1989; Forestier y col., 1991; McAuley y col., 1994; Vergani y col., 1998).

En nuestro estudio se ha demostrado la utilidad de las muestras de sangre, orina y LCR de los recién nacidos para la detección de la toxoplasmosis congénita. Las muestras de sangre y LCR han sido útiles tanto en los casos sintomáticos como asintomáticos. No se tienen datos sobre el periodo de parasitemia en recién nacidos, pero en nuestro estudio se ha detectado *Toxoplasma* en sangre en niños a los 24, 30 y 38 días de vida (casos 6, 5, 14 y 9). No obstante, hay que señalar que estos niños presentaban sintomatología y además no mostraron respuesta inmunológica específica propia, por lo que la infección se mantenía activa.

La detección en orina se presenta interesante ya que esta muestra ofrece la ventaja de ser fácilmente accesible. La eliminación de *T.gondii* o antígenos del parásito por orina en la fase aguda hace que se hayan desarrollado estudios para su detección por métodos inmunoenzimáticos (Van Knapen y col., 1985; Dannemann y col., 1991; Letillois y col., 1995; McHugh y col., 1997; Gofii Laguardia, 1997), se desconoce, sin embargo, el periodo durante el cual el parásito o su genoma está presente en la orina. Los resultados obtenidos, ya reportados en nuestro estudio previo (Fuentes y col., 1996), confirman que el análisis de las muestras de orina por PCR puede ser un método válido para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita. Sin embargo, hay que constatar que la detección del parásito en orina sólo fue positiva en niños sintomáticos, quizás debido a

una mayor parasitación que en los asintomáticos. Hay que resaltar que en el estudio de muestras de orina sólo se pudieron incluir tres niños asintomáticos (en uno de ellos se presentó, además, inhibición de la PCR), por lo que la comparación entre ambos grupos requiere un estudio más amplio.

En general podemos confirmar la utilidad de la técnica PCR en muestras de sangre, LCR y orina para el diagnóstico rápido y sensible de la toxoplasmosis congénita, destacando un mayor grado de detección con el estudio de más de una muestra de cada paciente.

2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA TOXOPLASMOSIS EN MUJERES GESTANTES DE MADRID. VALORACIÓN DE LAS ACTUALES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS.

En la mayoría de hospitales y centros de salud de España se realiza el control sistemático y rutinario de las gestantes para detectar la toxoplasmosis o el riesgo de padecerla. Al igual que en otros países, como Francia y Austria, existe una gran controversia entre diferentes investigadores sobre la conveniencia de estos programas generalizados (Hall, 1992; Hartup y col., 1997; Barder y col.1997; Tulliez,1998).

El riesgo de padecer primoinfección por *T.gondii* durante el embarazo depende fundamentalmente de la población susceptible, no inmunizada, y del grado de exposición a los distintos factores de riesgo, que varían en función del área geográfica estudiada. En nuestro estudio se determinó la seroprevalencia e incidencia en gestantes de Madrid, las variables epidemiológicas implicadas y se valoraron las técnicas diagnósticas utilizadas.

2.1. SEROPREVALENCIA E INCIDENCIA DE LA TOXOPLASMOSIS EN MUJERES GESTANTES DE MADRID.

Las seroprevalencias detectadas en el Área 5 y Área 11 de Madrid no presentaron diferencias significativas en el periodo estudiado (96-97), por lo que se consideró una seroprevalencia media del 25,4% (IC 95%, 24,5-26,3). Esta prevalencia es menor que la encontrada en estudios anteriores, pues en el año 1991 fue del 46% (Domingo y col.,

1991). La disminución en la prevalencia en las últimas décadas también ha sido observada en estudios realizados en Francia, Suiza y Reino Unido (Jenum y col., 1998 b; Allain y col., 1998), siendo atribuida a diferentes causas como puede ser el aumento de las medidas de higiene, el consumo generalizado de comida congelada y la mayor difusión de información sobre medidas preventivas (Allain y col., 1998).

Esta seroprevalencia, aunque es equivalente a la hallada por Guerra-García y Fernánandez-Sampedro (1995) que obtuvieron un 25,7% en mujeres embarazadas de Málaga, es marcadamente inferior a la detectada en diferentes zonas de España, así fue del 38,2% en Valladolid (Higuero y col., 1991), 49,7% en Cantabria (Rodríguez-Feijoo y col., 1994), 48% en Lugo (San Miguel y col., 1990) y 49% en el País Vasco (Pérez-Tallero y col., 1987). En un estudio realizado en once Comunidades Autónomas se estimó una seroprevalencia global del 45,74% (Domingo, 1996).

La tasa de seroprevalencia encontrada también nos indica que existe un porcentaje elevado (75%) de gestantes no protegidas frente al protozoo y expuestas al riesgo de adquirir una primoinfección, en las que se consideran fundamentales las medidas profilácticas e higiénicas para evitar la infección (Frenkel, 1998). En estas mujeres es interesante, de acuerdo a diversos autores (Higuero y col., 1991; Rodríguez-Feijoo y col., 1994; Guerra-García y Fernández-Sanpedro, 1995) mantener el cribado, control y seguimiento durante el embarazo.

La incidencia (1,8%), hallada según los criterios clásicos de infección primaria (en resumen: (i) seroconversión de IgG, (ii) aumento de 4 o más veces el título de IgG o (iii) presencia de IgM específica) es comparable a la encontrada en estudios epidemiológicos anteriores (0,5-1%) (Papoz y col., 1986), pero resultó, en nuestro estudio, mucho mayor que la incidencia real (0,14%) determinada con los nuevos criterios ((i) seroconversión IgG, (ii) presencia de IgM y bajo índice de avidez de IgG o (iii) presencia de IgM e IgA con índice de baja avidez o valor límite). La incidencia real, comparada con los estudios realizados en otros países siguiendo los nuevos criterios, es similar a la hallada en Noruega (0,17%) (Jenum y col., 1998), pero inferior a la encontrada en Finlandia (0,24%) (Lappalainen y col., 1992) y el Reino Unido (0,4%) (Allain y col., 1998).

2.2. DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSIS EN MUJERES EMBARAZADAS Y RECIÉN NACIDOS.

De acuerdo a lo expuesto por Lebech y col., (1996), la definición de caso de primoinfección por *Toxoplasma gondii* en gestantes y congénitos se deriva de tres fuentes de información que incluyen los estatus serológico, parasitológico y clínico. Ya que el estudio clínico no aporta datos concluyentes, es fundamental la información procedente de las otras fuentes.

Dado que las pruebas diagnósticas rutinarias no son capaces de determinar con seguridad una infección activa reciente, se realizó el estudio serológico y parasitológico completo de aquellas gestantes que presentaban alguno de los criterios de infección primaria clásicos.

2.2.1 Diagnóstico serológico

Detección de anticuerpos IgG

Para la detección de anticuerpos IgG se empleó la técnica IFI por ser una prueba asequible, sensible y específica, cuyos resultados apenas difieren de los obtenidos por el dye-test (Joss, 1992). La IFI ha sido utilizada como método de referencia por diversos investigadores (Olseen y Root, 1994; Elsaid y col., 1995; Obwaller y col., 1995). Esta técnica permite un seguimiento cuantitativo de la evolución del título de anticuerpos. Hay que destacar que el título de anticuerpos IgG en el momento de detección de la gestante con IgM positiva, presentó en el 96% de los casos títulos medios (49%) o altos (47%), que se mantuvieron a lo largo del seguimiento en el 93% de los casos. Estos resultados concuerdan con lo observado en el estudio de Jenum y Stray-Pedersen (1998), en el que incluso se muestra el incremento de títulos altos durante varios meses tras la primoinfección, confirmando que no son indicativos de infección reciente ni siquiera correlacionándolos con la presencia de IgM. Por otro lado, un caso de seroconversión detectado en nuestro estudio (caso 4) presentó títulos medios durante todo el seguimiento, por lo que un título medio no excluye la infección activa. Además, para alcanzar un título alto no se requiere una evolución de meses, pues hemos podido seguir una seroconversión (caso 1) que pasó de un título 1/64 a 1/4000 en treinta días.

Dados los óptimos resultados obtenidos en estudios anteriores, la avidéz de los anticuerpos IgG -antiToxoplasma fue medida en función de la disociación del enlace de hidrógeno con la urea como agente desnaturalizante, si bien se han utilizado otros

compuestos como bajas concentraciones de dietilamina, guanidina o tiocianato (Hedman y col., 1989, Hedman y col., 1993).

Aunque se han descrito otros métodos (Verhofstede y col., 1987, Ory y col., 1995), la técnica utilizada en la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha para la detección de la avidéz es el ELISA, por lo que en nuestro estudio se realizó un ELISA no comercial siguiendo el protocolo descrito por Lappalainen y col., (1993).

El método para calcular el índice de avidéz de IgG difiere en diferentes estudios. En nuestro caso se siguió con el método de Lappalainen y col., (1993), que realiza la titulación de cada muestra calculando los títulos con urea y sin urea, que ha sido utilizado en diferentes estudios con buenos resultados (Hedman y col., 1989; Lappalainen y col., 1993; Jenum y col., 1998). Otro método utilizado consiste en analizar una sola dilución del suero y comparar la densidad óptica (DO) del pocillo lavado con urea y sin urea (Holliman y col., 1994); sin embargo algunos autores han encontrado dificultades con este método ya que la avidéz parece variar dependiendo de la cantidad total de anticuerpos IgG (Jenum y col., 1998).

Nuestros resultados confirman lo observado por otros autores que muestran que la infección aguda y crónica de *Toxoplasma* puede ser generalmente diferenciada por la presencia de baja o alta avidéz IgG y que la avidéz se incrementa durante 3-4 meses tras la infección después de una meseta. Sin embargo, la maduración de la avidéz de las IgG específicas sigue estudiándose extensamente ya que, aunque la mayoría de los casos de infección han sido asociados a la avidéz esperada según la duración de la infección, se han encontrado resultados discordantes de infección aguda con alta avidéz e infección crónica con baja avidéz (Holliman y col., 1994). Lappalainen y col., (1993), en el seguimiento de 11 mujeres con baja avidéz, observaron que una mantuvo niveles bajos al cabo de 11 meses. En un estudio más amplio Jenum y col., (1998) comprobaron en algunos casos la persistencia de baja avidéz durante más de 20 semanas tras la infección, por lo que un índice de baja avidéz no puede garantizar una infección reciente. A pesar de todo, la mayoría de los estudios aceptan que un índice de baja avidéz indica una alta probabilidad de infección aguda. En nuestro trabajo hubo dos casos en los que la detección de la seroconversión permitió precisar el momento de la infección, y en ellos el índice de baja avidéz se mantuvo durante un periodo inferior a 4 meses. Por otro lado, nuestros resultados están de acuerdo con la mayoría de los estudios coincidiendo en que un índice de alta avidéz puede excluir la infección aguda

dentro de los 4-5 meses previos a la determinación serológica (Hedman y col., 1989; Lappalainen y col., 1993; Jenum y col., 1998).

Hay que considerar también los resultados de valor límite del índice de avidéz pues, aunque en nuestro estudio se observó su persistencia hasta de cinco meses, no puede ser descartado como indicativo de primoinfección durante el embarazo. De hecho, en tres casos de seroconversión (caso 1, 3 y 4) el índice mostró un valor límite en un tiempo estimado entre uno y dos meses tras la adquisición de la infección.

Por todo ello la determinación de la avidéz de IgG es de gran interés, pero debe ser interpretada en paralelo con otras pruebas, de acuerdo con lo expuesto por varios autores (Holliman y col., 1994; Rodríguez y col., 1996).

Detección de anticuerpos IgM

Se utilizó la técnica de ELISA de captura anticadena- μ por ser más sensible que los ELISA convencionales (Hofgartner y col., 1997, Wilson y col., 1997).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con los observados en estudios anteriores que confirman la persistencia de IgM durante meses tras la primoinfección (Joss, 1992; Lappalainen y col., 1993; Holliman y col., 1994; Domingo y col., 1996; Hofgartner y col., 1997; Benítez y col., 1998; Jenum y Stray-Pedersen, 1998). En nuestro caso, el 91,6% de las mujeres mantuvo la presencia de IgM en todo el periodo de seguimiento, que llegó en algún caso a ser de 15 meses; el 7,4% restante la perdió entre uno y cuatro meses después de la primera extracción.

Hasta hace poco, y aún sigue sucediendo en diversos ámbitos, la detección de IgM conducía normalmente a la consideración de una primoinfección activa que originaba un estado de alarma en la gestante y a la realización de tratamiento o el aborto terapéutico. Nuestros resultados confirman que la presencia de IgM no significa la detección de una infección reciente o de caso agudo, aunque sigue resultando de interés como prueba de apoyo al diagnóstico.

Detección de anticuerpos IgA

En nuestro estudio se detectó la presencia de IgA en todos los casos que fueron considerados y confirmados como primoinfección y no se detectó en los demás, por lo que coincidimos con otros autores en considerar la IgA como un marcador de interés de la infección activa (Patel y col., 1993; Foudrinier y col., 1995; Kumolosasi y col., 1996;

Hezard y col., 1997). Sin embargo, no puede ser considerada como único marcador ya que en diferentes estudios se ha encontrado la posibilidad de mantener niveles detectables de IgA hasta siete meses tras la infección (Rodríguez y col., 1996; Gutiérrez y col., 1997), aunque en nuestro estudio el tiempo máximo de detección fueron tres meses. Otro factor determinante es que los resultados negativos no excluyen la posibilidad de primoinfección (Jenum y Stray-Pedersen, 1998).

Determinación serológica de primoinfección

De las mujeres seguidas en el estudio, que por los criterios tradicionales estaban incluidas dentro del grupo de primoinfección, sólo diez (11,9%) fueron confirmadas por los nuevos criterios seleccionados según lo expuesto por otros autores (Lappalainen y col., 1992; Lebech y col., 1996).

Lebech y col., (1996), integrantes de la Red de Investigación Europea sobre la Toxoplasmosis Congénita, determinaron cinco categorías excluyentes de probabilidad de infección, seleccionando criterios serológicos, parasitológicos y clínicos: (i) infección definitiva, (ii) infección probable, (iii) infección posible (iv) infección poco probable y (v) no infectado. Las cuatro gestantes que presentaron seroconversión en nuestro estudio quedan claramente incluidas dentro de la primera categoría y las otras seis dentro de la segunda. Dado que los criterios seleccionados por estos investigadores son muy rigurosos y no incluyen el estudio del índice de avididad de IgG, nosotros consideramos que las otras seis gestantes presentan suficientes criterios serológicos para ser consideradas primoinfecciones.

Con lo observado en nuestro estudio se comprueba que, a falta de una seroconversión que marque de forma definitiva y concreta el momento de la primoinfección, la determinación de un caso de infección reciente necesita el estudio de los diferentes marcadores serológicos en conjunto, no pudiendo una prueba ser considerada como única.

Recién nacidos

El bajo nivel de participación en el seguimiento de los neonatos de las gestantes estudiadas permitió el control de sólo 25 (29,8%) recién nacidos, siendo cuatro hijos de gestantes con primoinfección confirmada. Ninguno presentó criterios serológicos de infección congénita, ya que los anticuerpos IgG se negativizaron antes del año de vida y no se detectó la presencia de IgM e IgA. Pero la ausencia de estos anticuerpos al nacer no puede excluir la infección congénita (Desmonts y col., 1985; McAuley y col., 1994;

Foudrinier y col., 1995; Lynfield y Eaton, 1995; Hartup y col., 1997; Hezard y col., 1997). Además, diferentes autores han reseñado la disminución o ausencia de anticuerpos IgA e IgM si las madres fueron tratadas con pirimetamina-sulfonamida durante la gestación (Pinon y col., 1996, Couvreur y col., 1993). Considerando que en nuestro estudio la mayoría de las madres fueron tratadas, sobretudo aquellas en la que se confirmó la primoinfección, coincidimos con otros autores en que el cribado serológico neonatal no es suficiente (Lappalainen y col., 1992). Por último, aunque es comúnmente aceptado que no hay infección congénita si se negativizan los anticuerpos IgG antes del año, se han reportado casos de niños con toxoplasmosis congénita que perdieron los anticuerpos antes del año tras el tratamiento adecuado al nacer, siendo importante la valoración de otras pruebas que complementen a las serológicas (McAuley y col., 1994 ; Jenum y col., 1998; Pinon y col., 1996).

No pudo determinarse la tasa de transmisión al feto en las primoinfecciones debido al bajo número obtenido y a la falta de seguimiento de la mitad de los niños de estas madres, además de la posibilidad de que el tratamiento de la madre pueda influir en la menor transmisión al feto (Jenum y col., 1998). La infección en los abortos de dos gestantes con primoinfección no fue confirmada por no tener muestras para el análisis. El aborto espontáneo ocurrido pudo ser debido a la infección por *T.gondii*, pues se originó en el primer trimestre de gestación.

2.2.2. Detección de *Toxoplasma gondii*

El estudio parasitológico de las gestantes y recién nacidos se realizó mediante la detección del ADN del parásito por PCR y el aislamiento en ratón. Las muestras seleccionadas fueron principalmente sangre y orina por la facilidad y accesibilidad de las tomas y porque confirman la infección activa, dado que en ellas el *Toxoplasma* sólo se encuentra, normalmente, durante esta fase. También se procesaron otras muestras que fueron remitidas por determinación del médico implicado en el seguimiento de la paciente.

Hay que destacar que en el estudio de las gestantes, el tiempo mínimo transcurrido desde la detección de la posible primoinfección hasta que se recogieron las muestras fue de 15 días, estando ya, en muchos casos, la embarazada en tratamiento, por lo que los resultados pudieron estar afectados.

Detección del ADN de *Toxoplasma gondii* por PCR

Gestantes

El diagnóstico por PCR en mujeres gestantes ya se ha discutido ampliamente en el apartado 1.2.3.4., por lo que pasaremos a reseñar de forma más sucinta y particular lo observado en las embarazadas seguidas en este estudio.

La PCR secuencial interna detectó la presencia de *T.gondii* en sangre de una gestante con primoinfección, lo que permite confirmar una infección activa. Sin embargo, la no detección del genoma del parásito en la muestra no excluye la infección, por lo que la utilización de la PCR en sangre y orina de forma rutinaria aporta un valor limitado.

La aplicación de la PCR en líquido amniótico está dando buenos resultados y abre perspectivas muy interesantes para el diagnóstico prenatal, aunque algunos autores consideran que presenta dos consecuencias negativas: el incremento del número de amniocentesis innecesarias con riesgo para el feto, y el menor seguimiento posterior de los niños con diagnóstico prenatal negativo (Hezard y col., 1997). Hay que señalar que la elección y duración del tratamiento antiparasitario de la gestante depende de si el feto está infectado o no, pues en ese caso se recomienda un tratamiento más agresivo que la espiramicina, generalmente con pirimetamina-sulfonamida que presenta más efectos secundarios (Vergani y col., 1998; Jenum y col., 1998).

Para comprobar la transmisión transplacentaria se ha realizado la detección del parásito por aislamiento en ratón o por PCR en muestras de líquido amniótico (Desmonts y col., 1985; Hohlfield y col., 1994; Jenum y col., 1998; Forestier y col., 1998). Algunos autores exponen los problemas derivados de esta técnica invasiva con riesgo de pérdidas fetales, próximas al 3,4% en la cordocentesis (Vergani y col., 1998), aunque mucho menor en la toma de líquido amniótico (Hezard y col., 1997). Los buenos resultados obtenidos con PCR en esta última muestra han hecho que la técnica de cordocentesis sea innecesaria (Thulliez, 1998a); en cualquier caso, por su riesgo, consideramos que sólo ha de realizarse en aquellos casos en los que se haya confirmado la primoinfección materna.

Por lo antes expuesto, dada la imposibilidad de obtener líquido amniótico de forma sistemática en nuestro estudio, sólo se realizó el análisis de cinco muestras, cuatro de ellas pertenecientes a gestantes con primoinfección. Los resultados demostraron la detección genómica en el líquido amniótico en el caso de una gestante cuya sangre

también fue positiva por PCR, demostrando la transmisión transplacentaria. En un caso la prueba presentó inhibición y en otro, negativo, no se siguió al niño. En los otros dos casos en los que no se detectó el genoma del parásito en el líquido amniótico, los niños fueron seguidos sin que desarrollan toxoplasmosis congénita, por lo que se confirmó el resultado negativo de la prueba indicando la no transmisión transplacentaria.

Consideramos que la PCR es un método rápido y sensible para la detección de la infección fetal durante la gestación (Hohlfeld y col., 1994; Jenum y col., 1998 a y b). No obstante, de acuerdo a lo expuesto en diferentes estudios, no todos los casos de infección congénita se detectan prenatalmente aunque se utilice la combinación de diversas técnicas (Hezard y col., 1997. Berrebi y Kobuch, 1994; Verzani y col., 1998, Jenum y col., 1998 a y b; Thulliez, 1998a). Consideramos que la aplicación de la PCR se debe apoyar con otros métodos y que el diagnóstico de infección congénita debe basarse no sólo en la detección del parásito por PCR sino también en el seguimiento clínico y serológico del neonato.

Recién nacidos

Los resultados obtenidos con la PCR en las muestras de sangre, orina y LCR analizadas en nuestro estudio fueron negativos, menos en un caso, confirmando la no infección de 24 neonatos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el seguimiento serológico. En un caso se detectó el genoma del parásito en muestra de sangre y LCR.

Clásicamente se ha considerado criterio de infección congénita la persistencia de IgG durante el primer año de vida (Desmons y col., 1985). En nuestro estudio se sospechó que una niña podía estar infectada congénitamente ya que se detectó *T.gondii* por PCR en LCR y sangre, aunque no presentó anticuerpos IgM ni IgA, y la IgG fue negativa antes del año. No se consideró en principio que la madre tuviera primoinfección gestacional, pues los únicos datos serológicos que se tenían eran del tercer trimestre, con IgM elevada y alta avidez de IgG; estos datos, sin embargo, no descartan una infección en el primer trimestre o principio del segundo. Dado el riesgo de contaminación existente en la técnica PCR, existía la posibilidad de un falso positivo pero todos los controles permanecieron correctos; el hecho de que la segunda muestra, procesada independientemente, resultara también positiva descartó el doble error. Además, en el estudio de Jenum y col., (1998) realizado con 35.940 gestantes se encontraron tres niños infectados congénitamente y que perdieron los anticuerpos IgG antes del año de vida, siendo diagnosticados por PCR y aislamiento en ratón. Esto indica que no siempre

persiste la IgG específica más de un año en niños infectados congénitamente y que han recibido tratamiento específico (Jenum y col., 1998; Pinon y col., 1996). Una posible modificación de los títulos de IgG tras tratamiento también ha sido mencionada por Lebech y col., (1996) y Hezard y col., (1997). Por lo tanto, la PCR permitió detectar un caso que no habría sido diagnosticado y con ello instaurar el tratamiento adecuado para evitar posteriores complicaciones de acuerdo a lo expuesto por diferentes autores (Pallas Alonso y Gomez Castillo; 1993; McAuley y col., 1994; Lynfield y Eaton, 1995).

Aislamiento por inoculación a ratón

Las muestras de gestantes y neonatos inoculadas a ratón fueron negativas, incluidas aquellas de la recién nacida que había sido positiva por PCR.

Las muestras de sangre y líquido amniótico de la gestante que fueron positivas por PCR no pudieron ser inoculadas a ratón, por lo que no se pudieron correlacionar los resultados obtenidos en este caso. En cuanto al aislamiento de las muestras de la recién nacida, hay que destacar que se inocularon cantidades muy pequeñas debido a la escasez de muestra extraída al ser un neonato, pero el volumen procesado fue el mismo que el empleado en la PCR. En nuestro estudio se comprobó una mayor sensibilidad con esta técnica, como también se ha visto en otros trabajos (Hohlfeld y col., 1994; Jenum y col., 1998), aunque sigue considerándose de gran utilidad el aislamiento ya que complementa los resultados de PCR pues en casos de baja parasitación puede ser más sensible al poder inocular al ratón una cantidad de muestra superior (Thulliez, 1998). Sin embargo, la técnica PCR puede realizarse con muestras mantenidas en diferentes condiciones de almacenamiento que pueden influir en la viabilidad del parásito (James y col., 1996).

2.3 Variables epidemiológicas implicadas en la toxoplasmosis.

Se realizó un estudio de casos y controles en las gestantes de Madrid, con el fin de localizar aquellos factores de riesgo implicados en la epidemiología de la toxoplasmosis en nuestro medio y poder realizar una correcta prevención de la infección en las gestantes no inmunes.

En nuestro estudio se valoraron los principales factores de riesgo establecidos en diversos estudios epidemiológicos (Ruiz y Frenkel, 1980b; Sousa y col., 1988; Frenkel, 1998b), recogiendo información sobre los hábitos en la alimentación cárnica, higiene en el consumo de verduras y frutas, relación con gatos, contacto con tierra y trabajo profesional.

El estudio epidemiológico realizado por del Castillo y Herruzo (1998) en niños entre 2 y 14 años de edad mostró una curva bimodal de prevalencia de anticuerpos. Se relacionó una primera fase de infección de la población infantil, que se infecta a través de la tierra, y un segundo incremento, entre los 8 y 14 años, con la aparición de un nuevo factor de riesgo que podría corresponder a la alimentación cárnica, ya que a esa edad se incrementa el consumo de carne de riesgo. Esta observación concuerda con el tercer patrón epidemiológico expuesto por Frenkel (1998b) que se observa en Francia y otros países mediterráneos, compatible con la transmisión de ooquistes en la infancia continuándose en la vida adulta con la ingesta de quistes de carne mal cocida.

En nuestro trabajo no se encontró asociación entre la seroprevalencia de *T.gondii* y el consumo de verduras y frutas, observando que el hábito de lavarlas fue generalizado (98%) en las mujeres encuestadas. Tampoco se encontró asociación con el contacto con la tierra, expresado en realizar labores de jardinería u otros contactos como deportes o juegos relacionados, ni con las profesiones de riesgo, como las relacionadas con la carne, animales o tierra. La significación del contacto con el suelo y tierra posiblemente contaminada con ooquistes de gato ha sido demostrada en diferentes estudios (Frenkel y col., 1975; Contreras y col., 1996; Frenkel, 1998; Bobic y col., 1998). En nuestro estudio, sin embargo, no se vio relación con estos factores, quizás debido a la mejora de los hábitos higiénicos estando de acuerdo con lo observado por otros autores (Papoz y col., 1986; Bobic y col., 1998). Además, la mayoría de las gestantes estudiadas vivían en el casco urbano de Madrid o en zonas próximas, supuestamente con un menor contacto con tierra contaminada ya que los gatos callejeros están siendo controlados.

Encontramos diferencias significativas en el hábito de la preparación de la carne hallando una clara asociación (OR:3,7) con el consumo de carne poco hecha, igual que se observa en otros estudios (Lynfield y Eaton, 1995; Contreras y col., 1996). De igual forma, se halló asociación entre comer carne frita fuera del hogar y enfermedad (OR:2,9), quizás por la costumbre de los comedores colectivos y restaurantes de

presentar la carne menos hecha además de que también se encontró asociación con el hábito de consumo de carne poco hecha en estas ocasiones (OR:5,8).

El consumo esporádico de hamburguesas, considerada carne de riesgo (Masur y col., 1978; Cour y col., 1988), no demostró ser significativo, aunque se encontró una fuerte asociación si la frecuencia de comerlas era mayor de una vez por semana (OR: 21,3), por lo que una exposición frecuente marca una mayor oportunidad de contagio. No se encontró relación con el consumo de embutidos, también señalados como carne de riesgo (Castillo y Herruzo, 1998).

El gato es considerado como la clave de la epidemiología de la toxoplasmosis (Frenkel, 1998), marcándolo como el principal factor de riesgo en la transmisión, aunque en diferentes estudios no se ha podido demostrar dicha asociación (Broadbent y col., 1981; Di Giacomo y col., 1990) pues es difícil expresar la diversidad de factores que influyen en el riesgo que entraña el animal (tipo de vida, alimentación, edad) y la relación con el hombre. En nuestro estudio se encontró asociación entre el contacto con gatos y la seroprevalencia de toxoplasmosis (OR: 2,5), estando de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de Castillo y Herruzo (1998).

3. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Toxoplasma gondii* CON TÉCNICAS MOLECULARES

3.1. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA

La tipificación de las distintas cepas de *T.gondii* está siendo desarrollada en los últimos años para diferenciar y caracterizar poblaciones con el fin de conseguir un mejor diagnóstico, tratamiento y control, junto con la valoración de las implicaciones epidemiológicas y la determinación de marcadores de virulencia y resistencias dependientes de diferentes aislados. No existen estudios de tipificación realizados con cepas aisladas en España, por lo que se consideró interesante el conocimiento de las que están circulando en nuestro país.

Se decidió el desarrollo de la tipificación genómica de los diversos aislados incluidos en nuestro estudio ya que este análisis ofrece la ventaja de ser altamente estable dentro de un organismo a la vez que presenta diversidad entre cepas e incluso entre individuos, mientras que la caracterización fenotípica depende del estado de expresión de la célula

y del estado o fase del parásito dentro del ciclo biológico (Belkum, 1994). Así, en la caracterización de las cepas por su virulencia en ratón, se ha observado que los tratamientos subletales, anticuerpos específicos o citoquinas como el interferón- γ , o las condiciones de cultivo *in vitro* ejercen una presión de selección en la población, favoreciendo que la cepa se exprese como virulenta o no virulenta (Frenkel y Ambroise-Thomas, 1997).

La diversidad de métodos, sondas, iniciadores, etc., utilizados por los diferentes autores para la caracterización genotípica, muestra un panorama confuso y de discusión. Los principales estudios de análisis de genética de poblaciones indican que la propagación de *T.gondii* es principalmente, aunque no exclusivamente, clonal, con multiplicación asexual o sexual uniparental, lo que resulta en una inusual estructura de población consistente en tres linajes predominantes que han sido designados como cepas de tipo I, II y III (Dardé y col., 1992; Howe y Sibley, 1995). A pesar de esta marcada separación entre las tres líneas, la máxima divergencia genética entre las cepas de *Toxoplasma* es pequeña. Así, el análisis de las secuencias de los genes SAG1 y SAG2, que codifican las proteínas de superficie del taquizoíto SAG1 (P30) y SAG2 (P22), muestra aproximadamente un 1% de diferencias en la secuencia entre las cepas representativas de los 3 tipos. Además, las cepas recombinantes halladas en algunos estudios demuestran la existencia en la naturaleza de una recombinación sexual entre las diferentes líneas (Howey y Sibley, 1995; Frenkel y Ambroise-Thomas, 1997).

En el estudio realizado describimos un rápido y eficiente protocolo para analizar el genotipo de las cepas de *T.gondii* aisladas. El análisis genético fue determinado tras la realización de la técnica de PCR secuencial interna para la amplificación de los extremos 5' y 3' del gen SAG2 y el posterior estudio del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción originado tras la digestión de los productos amplificados (PCR-RFLP).

La selección de la técnica de PCR-RFLP para la identificación de los diferentes genotipos fue debido a la ventaja que esta técnica muestra al no necesitar la gran cantidad de ADN requerida en otras técnicas como las de RFLP. Para obtener el ADN es necesario el cultivo o pases en serie en animales con el riesgo de modificar la cepa o seleccionar clones particulares (Cristina y col., 1991b; Parmeley y col., 1994; Cristina y col., 1995). La técnica tampoco necesita que el ADN sea exclusivo del parásito, sin otros genomas contaminantes, como sucede con la RAPD que además es muy sensible a las

condiciones de la reacción, pudiendo verse afectada por las variaciones de equipos o reactivos (Guo y Jhonson 1995b; Guo y Jhonson 1997).

La PCR-RFLP puede realizarse en material crudo con ADN contaminante (Monis y Andrews, 1998) y, aunque es necesario conocer previamente la secuencia de nucleótidos diana a amplificar, detecta mínimas variaciones en un gen en el que la modificación de una base crea o anula un lugar de restricción. Además, si el análisis se realiza en regiones de secuencias codificadoras de proteínas, como sucede en nuestro caso, el polimorfismo detectado por PCR-RFLP tiene más probabilidades de correlacionarse con el fenotipo de las cepas (Parmley y col., 1994).

En el diagnóstico de la toxoplasmosis por PCR utilizamos la detección del gen B1 del parásito, pero este gen no es suficientemente polimórfico como para permitir la tipificación de cepas (Burg y col., 1989). El gen SAG2, por el contrario, es polimórfico y codifica dos formas diferentes de la proteína de superficie del taquizoíto SAG2 que son reconocidas por anticuerpos monoclonales específicos (Parmley y col., 1994). Las cepas de tipo I y III comparten el mismo alelo proteico, mientras que las de tipo II tienen un segundo alelo diferente. Estas características junto con el polimorfismo adicional que presenta el ADN, permite la identificación de los tres genotipos predominantes relacionándolos con los alelos 1, 2 y 3 del gen SAG2 (Parmley y col., 1994; Howe y Sibley, 1995; Howe y col., 1997).

El genotipado no suele basarse en un único marcador, sin embargo, en este caso es posible debido a la inusual estructura de población de *T.gondii*. Howe y Sibley (1995) realizaron el estudio de 106 cepas de *T.gondii* de distintos orígenes, con genotipado de diferentes locus (genes SAG1, SAG2, ROP1, 850, L328, 62) mostrando que la estructura de población es altamente clonal, consistente en los tres linajes principales. En el análisis de 103 cepas (97%) se observó que el alelo de SAG2 determinado en dicha caracterización las incluía dentro del tipo I, II o III. Esto indica que el genotipo de las cepas de *T.gondii* puede ser determinado con un alto grado de confianza analizando el gen SAG2.

Aunque en estudios anteriores utilizando PCR-RFLP se habían obtenido buenos resultados analizando cepas aisladas y crecidas en cultivos celulares (Howe y Sibley, 1995; Howe y col., 1997; Morgan y col., 1998), en nuestro estudio se consiguió por primera vez caracterizar las cepas directamente sobre el material biológico de procedencia, bien de cerebro o líquido ascítico de ratón en los bioensayos realizados

para el mantenimiento de la cepa, bien de la muestra parasitada del enfermo, como especificaremos más adelante.

El hecho de poder utilizar material crudo permitió la detección de los diferentes genotipos en muestras con ADN contaminante del hospedador, facilitando de esta manera la realización del proceso. Esto es importante en el caso de *Toxoplasma* pues necesita células nucleadas para su multiplicación, de forma que el aislamiento, en muchas ocasiones difícil, sólo puede realizarse en cultivos celulares o animales de experimentación. La invariabilidad de los resultados utilizando tanto material crudo como ADN específico purificado, fue confirmada en la caracterización de la cepa RH utilizando ADN de taquizoítos sin ADN extraño, y el ADN parasitario obtenido del líquido peritoneal de un ratón inoculado con dicha cepa en presencia de células contaminantes del hospedador.

La caracterización de las cepas de referencia originó un patrón que confirmó la inclusión de la cepa RH dentro del tipo I, las cepas Beverly y MC-49 en el tipo II y la cepa C-56 en el tipo III, de acuerdo a lo observado por otros autores (Parmley y col., 1994; Howe y Sibley, 1995), permitiendo la estandarización de la técnica.

3.2. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS DE *Toxoplasma gondii* CIRCULANTES EN ESPAÑA.

Caracterización de cepas procedentes de animales.

Las cepas autóctonas de *T.gondii* analizadas en nuestro estudio fueron de origen animal, aisladas y mantenidas en laboratorio por pases sucesivos en ratón.

La toxoplasmosis ovina tiene una gran repercusión sanitaria, siendo la carne de ovejas y corderos una fuente de infección importante en la transmisión al hombre y a otros hospedadores, por lo que se consideró interesante la caracterización de las cepas involucradas en la infección de este reservorio. Las diez cepas de ovino analizadas procedieron de la misma región geográfica (Zaragoza), obtenidas en el mismo año (1996) y fueron aisladas y mantenidas por bioensayo en ratón con la misma técnica. Todas estas condiciones permitieron una homogeneidad en el estudio, tal y como consideran diversos autores que debe ser tenido en cuenta para someterles a la misma presión de selección (Frenkel y Ambroise-Thomas, 1997; Mondragón y col., 1998).

En la mayoría de los estudios realizados no se ha prestado atención a la historia detallada de los pases y transmisión de los distintos aislados siendo, a veces, desconocida. Así, en el caso de la cepa RH, aislada originalmente en 1939 por Albert B. Sabin de un niño de Ohio, ha sido ampliamente difundida en diferentes laboratorios y conservada, en muchos de ellos, por pases de taquizoítos en líquido peritoneal de ratón dos o tres veces por semana. Diferentes líneas de esta cepa fueron comparadas por Howe y Sibley (1994) encontrando heterogeneidad. En otros trabajos se ha observado el incremento de patogenicidad de las cepas tras diferentes pases en ratón, pasando de avirulentas a virulentas (Guo y Jhonson, 1996; Frenkel y Ambroise-Thomas, 1997). Por todo ello es imprescindible el conocimiento de la historia de las cepas y realizar su caracterización lo antes posible tras el aislamiento. En nuestro estudio todas las cepas se mostraron avirulentas en ratón desde su aislamiento, no volviéndose virulentas tras los sucesivos pases.

A diferencia de lo realizado en los estudios de caracterización publicados hasta la fecha (Dardé y col., 1992; Cristina y col., 1995; Ambroise-Thomas y Okay, 1993; Guo y Jhonson, 1997; Howe y Sibley, 1995; Howe y col., 1997; Morgan y col., 1998), la caracterización genotípica por PCR-RFLP fue desarrollada directamente con muestras de cerebro o líquido ascítico del ratón parasitado en el mantenimiento de la cepa, no siendo necesario el crecimiento de los parásitos en cultivos celulares, con las importantes ventajas que esto supone. La técnica se mostró específica y concluyente en la caracterización de los diferentes aislados, permitiendo la inclusión de las diferentes cepas en los tres genotipos descritos y siendo los resultados repetitivos.

En el análisis genotípico de los diez aislados se encontraron cepas pertenecientes al genotipo I, II y III. El tipo II fue el más prevalente, contando con el 50% (5) de los aislados. El genotipo I fue encontrado en el 30% (3) y el III en el 20% (2). Estas prevalencias muestran diferencias con las encontradas en el estudio realizado por Howe y Sibley (1995) en el análisis de cepas aisladas de diferentes animales domésticos y salvajes, procedentes de diversos países, que mostró una prevalencia de 9% del tipo I (3); 44% del tipo II (15) y 47% del tipo III (16). En este estudio no fueron especificadas las especies de animales hospedadores, ni las áreas geográficas en las que habían sido aisladas las cepas, así como la historia de aislamiento que habían seguido. En cambio, en el estudio realizado por Mondragon y col., (1998) con el análisis de cepas aisladas de cerdos procedentes de la misma región geográfica (Iowa, EE.UU.), todas con la misma historia de aislamiento, las prevalencias encontradas

fueron del 83,7% de tipo II (36) y 16,3% de tipo III (7), mientras que no se aisló ninguna del tipo I.

Es de destacar que, en nuestro estudio, las cepas aisladas de los abortos fueron de tipo II, pudiendo indicar una mayor patogenidad de este genotipo en ovinos o la mayor prevalencia epidemiológica de este genotipo. La única cepa aislada procedente del hospedador definitivo, el gato, presentó igualmente un genotipo II.

En estudios previos, el genotipo II fue encontrado en la mayoría de las cepas aisladas de casos clínicos humanos (Dardé y col., 1992; Howe y Sibley, 1995; Howe y col., 1997), concordando con los resultados obtenidos en los estudios que muestran la mayor prevalencia del genotipo II en cerdos (Mondragon y col., 1998) y óvidos (Howe y col., 1997). Puesto que los óvidos pueden ser una fuente importante de infección humana, el dato sugiere que la asociación entre el genotipo II y la enfermedad es debida en parte a la prevalencia de estas cepas, sin embargo es necesario el análisis de un mayor número de aislados procedentes de múltiples orígenes para poder confirmar esta teoría.

Caracterización de cepas procedentes de muestras clínicas humanas.

En nuestro estudio se procedió a la caracterización de 15 cepas de *Toxoplasma gondii* obtenidas de muestras de enfermos, con el fin de conocer el genotipo que estaba originando patología humana en España.

Dada la dificultad presentada en la obtención, aislamiento y mantenimiento de las cepas, se intentó su caracterización directamente a partir de las muestras de enfermos, diagnosticadas como positivas por PCR, obviando el crecimiento de *Toxoplasma* en cultivos celulares o ratón. De esta manera se logra una detección por igual de todos los linajes, no basándose en la prevalencia de unos frente a otros por la mayor o menor dificultad de aislamiento. Además, no hay variación de los perfiles genéticos dentro de la misma cepa seguramente debida a que las manipulaciones seleccionan mutaciones diferentes (Howe y Sibley, 1994). Supone también la ventaja de poder tipificar cepas que se encuentran en muestras remitidas en congelación o en condiciones que no permiten la viabilidad del parásito.

En el estudio se utilizaron diversos tipos de muestras clínicas no afectando los resultados obtenidos.

La realización de la técnica PCR-RFLP en la muestra de origen permitió la caracterización completa concluyente del 73.3% de las cepas estudiadas (11) causantes de patología humana. Hay que señalar que de éstas, dos procedían del mismo enfermo, resultando en el análisis incluidas en el mismo genotipo, lo que abundó en la repetitividad del proceso de caracterización. En un 13,3% (2) la técnica permitió sólo la caracterización parcial de la cepa por la amplificación de sólo uno de los extremos del gen SAG2; al carecer de más muestra, no pudo reintentarse la amplificación. Esto supuso en uno de los casos la exclusión o no pertenencia de la cepa a un tipo determinado, pero permitió en el segundo caso la inclusión de la cepa en un genotipo específico. En el 13,3 % (2) de los casos no pudo amplificarse ninguno de los extremos de SAG2 por lo que no fue posible la caracterización de la cepa involucrada. Las posibles causas que impidieron la caracterización fueron la escasez de material, que podría no presentar suficiente ADN del parásito para ser detectado, y la posible degradación del ADN durante el almacenaje de las muestras a 4°C. No obstante, los resultados obtenidos suponen una importante mejora en las condiciones y aplicación de la técnica para la caracterización genómica de las cepas circulantes de *Toxoplasma gondii*.

Los aislados humanos examinados por el análisis de RFLP no fueron de un genotipo único. Se detectó una prevalencia general del 33% (4 aislados) pertenecientes a cepas de tipo I, 25 % (3) al II y 33% (4) al III. Otros patógenos responsables de infecciones oportunistas, como *Cryptosporidium*, presentan una similitud entre sus aislados humanos (Tibayrenc, 1990). En el caso de *Toxoplasma* la variedad de genotipos hallados es probablemente debida a las diferencias epidemiológicas que limitan la oportunidad de infección humano-humano (Sibley y Boothroyd, 1992) y a la variedad de fuentes de infección implicadas en la transmisión (Frenkel, 1998b).

En nuestro estudio no se encontró correlación aparente entre los genotipos de las cepas detectadas y la sintomatología desarrollada, observándose que los tres genotipos originan patología y pueden ser virulentos en el hombre. Los dos casos inicialmente asintomáticos analizaron una parasitación por una cepa de tipo I en el caso de una gestante, pero no fue confirmada la posible afectación del recién nacido al no controlarse posteriormente, y por una cepa de tipo III en el caso de un recién nacido asintomático. Es necesario el análisis de un mayor número de cepas para poder establecer una clara relación entre genotipo y virulencia o patogenia en el hombre.

Teniendo en consideración el total de cepas analizadas, los genotipos más prevalentes fueron el I y el III, siendo menos prevalente el II. Estos resultados difieren de los hallados en otros estudios en los que el genotipo II fue encontrado en la mayoría de las cepas aisladas de casos clínicos humanos (Dardé y col., 1992; Howe y Sibley, 1995; Howe y col., 1997).

No obstante, en las cepas aisladas de enfermos VIH+, que presentaban en su totalidad síntomas neurológicos y encefálicos, predominaron los genotipos II y III sobre el I, por lo que con el estudio de un mayor número de cepas se podría apoyar la hipótesis formulada por Gross y col. (1997). Esta hipótesis muestra las diferencias específicas de cepas de tipo I y de tipo II, encontradas en la diferenciación y transformación de estado (de taquizoíto a bradizoíto). Mediante la detección *in vitro* de antígenos de bradizoítos (abs), expresados a los cuatro días de la inoculación de taquizoítos, estos autores hallaron que el 50% de las cepas de tipo II expresaban abs, frente al 5-10% de las cepas de tipo I. Esta observación, junto con la asociación de las cepas de tipo II con la TE en pacientes VIH+ indicada por diferentes autores (Howe y Sibley, 1995; Gross y col., 1997), muestra el mayor potencial de las cepas de tipo II de transformarse en bradizoítos, por lo que los pacientes infectados con el tipo II pueden desarrollar más quistes en el cerebro que los infectados por el tipo I. Además, las cepas de tipo I expresan en mayor proporción el antígeno inmunodominante SAG1, favoreciendo la multiplicación de los taquizoítos y los síntomas en la fase aguda, pero pueden ser más fácilmente eliminados por la respuesta inmune celular y humoral, llevando a la erradicación, o por lo menos al control, de la infección tras la fase aguda.

La presencia de factores externos como el interferón- γ , mediante la formación del NO, ha sido identificada como estabilizadora de la fase de quiste (Gross y col., 1997) por lo que el descenso de los niveles de éste, como ocurre en los pacientes con SIDA, puede favorecer la reactivación de la toxoplasmosis crónica. Ya que las cepas de tipo II son más cistógenas, su reactivación originando TE puede ser más común en estos pacientes. No obstante es necesario la caracterización de un mayor número de cepas aisladas de pacientes con SIDA y de inmunocompetentes para confirmar estas observaciones.

La posibilidad de la influencia del genotipo del parásito en la severidad de la enfermedad humana puede basarse en la diferencia de patogenidad de las cepas en los modelos animales. Las cepas de tipo II producen un mayor número de quistes en ratón y son más propensas a reactivarse en ratones inmunocomprometidos, mientras que las cepas

de tipo I suelen ser virulentas en ratón y originan una mayor parasitemia. Esta parasitemia puede incrementar el riesgo de transmisión transplacentaria o la severidad de la infección en el feto en desarrollo (Howe y Sibley, 1995). Esta hipótesis se puede ver apoyada por los resultados obtenidos en nuestro trabajo con las cepas de los casos de toxoplasmosis congénita estudiados, tanto del líquido amniótico de la gestante que fue del genotipo I, como de los dos neonatos seguidos, las cuales fueron del genotipo I y III. No se pudo comprobar la patogenicidad de la cepa detectada en el líquido amniótico al no ser seguido el recién nacido; la cepa de genotipo I originó una sintomatología grave en el recién nacido, mientras que la cepa del genotipo III se aisló del niño asintomático al nacer. No obstante, es necesario el estudio de un mayor número de cepas aisladas tanto de casos congénitos, como de casos crónicos o asintomáticos para poder determinar la fuerza de esta hipótesis ya que difiere con los resultados obtenidos en el estudio realizado por Howe y col. (1997) en París. Estos autores hallaron que las cepas de casos congénitos, aisladas de líquido amniótico, fueron de tipo II, pero no se reportó si ocasionaron síntomas en el feto. Además en este estudio el 81% del total de las cepas analizadas, incluyendo diferentes grupos de riesgo, fueron de este tipo, pudiendo estar relacionada la presencia en casos congénitos con una mayor prevalencia epidemiológica de este genotipo en esa área o en la principal fuente de infección.

En nuestro estudio el análisis por PCR-RFLP se ha mostrado sensible y con posibilidad de realizarse en las muestras clínicas originarias tomadas para detectar la toxoplasmosis. Se ha conseguido un certero y rápido genotipado con este método y permite el estudio retrospectivo de muestras clínicas que hayan sido conservadas durante años en diferentes laboratorios. Una ampliación futura de este estudio será interesante y necesaria para conseguir un mejor conocimiento de la asociación entre los genotipos del parásito y la toxoplasmosis humana así como de la situación epidemiológica. La utilización de técnicas moleculares puede servir para identificar los factores genéticos que influyen en la toxoplasmosis, tales como los genes que controlan la patogenicidad, la transmisión y la producción de quistes latentes. De esta forma se podrá clarificar las bases biológicas para la asociación entre genotipo de *T.gondii* y la enfermedad en humanos y animales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De la aplicación de las técnicas moleculares en el diagnóstico y detección de *Toxoplasma gondii*.

Primera

La alta especificidad y sensibilidad obtenida con la PCR secuencial interna mediante la amplificación del gen B1, tanto en muestras experimentales como clínicas, permite destacar esta técnica en el diagnóstico de la toxoplasmosis.

Segunda

La coamplificación de un control positivo interno es importante para la detección de inhibidores inespecíficos, evitando resultados falsos negativos.

Tercera

Respecto a la detección de *Toxoplasma gondii* por PCR en diversos tipos de muestras, los mejores resultados en la extracción de ADN fueron los obtenidos con la digestión con tampón de lisis y proteinasa K, excluyendo las de sangre y las conservadas en parafina o formol. Se demostró un mayor rendimiento en las muestras de sangre con el sistema de extracción comercial (Wizard genomic, Promega), y en las conservadas en parafina y formol con el tratamiento con resinas de intercambio iónico.

Cuarta

La aplicación de la técnica de PCR permitió el diagnóstico de la toxoplasmosis en los pacientes incluidos en los principales grupos de riesgo (SIDA, inmunodeprimidos, inmunocompetentes, gestantes y neonatos). La selección de las muestras más adecuadas, según los cuadros clínicos, permite la obtención de mejores resultados; así, es de elección en la toxoplasmosis encefálica el líquido cefalorraquídeo; en la pulmonar, el lavado broncoalveolar; en la ocular, el humor vítreo; en la toxoplasmosis diseminada tanto la sangre como diferentes fluidos o biopsias; en gestantes, el líquido amniótico y en congénitos, la sangre, orina y líquido cefalorraquídeo. La sensibilidad del diagnóstico por PCR se incrementa combinando el estudio de diferentes tipos de muestras y analizando muestras secuenciales.

Del estudio epidemiológico de la toxoplasmosis en mujeres gestantes de Madrid. Valoración de las actuales técnicas diagnósticas.

Quinta

La seroprevalencia de la toxoplasmosis en gestantes hallada en Madrid fue del 25,4%, mostrando un descenso importante en la última década. La incidencia hallada según los criterios clásicos de infección fue del 1,8%, muy superior a la incidencia real considerando los nuevos criterios que incluyen el índice de avidéz de IgG, estimada en 0,14%.

Sexta

Los factores de riesgo asociados a la infección fueron relacionados con el consumo de carne poco hecha, frecuencia de consumo de hamburguesas y el contacto con gatos.

Séptima

El estudio rutinario de muestras de sangre y orina de las gestantes por PCR, no resultó de utilidad en la detección de la primoinfección, debido a la parasitemia transitoria en personas inmunocompetentes. Se comprobó que la detección de la primoinfección en gestantes, mediante el diagnóstico serológico, a falta de una seroconversión que marque de forma concreta el momento de infección, necesita el estudio en conjunto de diferentes marcadores serológicos, siendo de gran interés el índice de avidéz de IgG, pero no como prueba única.

Octava

La técnica de PCR se mostró como un método rápido y sensible en el diagnóstico de toxoplasmosis congénita, tanto en el diagnóstico prenatal en líquido amniótico como en el postnatal en diferentes muestras; sin embargo debe completarse con el seguimiento clínico y serológico del recién nacido.

De la caracterización de cepas de *T.gondii* con técnicas moleculares.

Novena

El genotipado de las cepas de *T.gondii*, basado en la técnica PCR-RFLP aplicada al gen polimórfico SAG2, por el que se identificaron los tres genotipos predominantes (genotipos I, II, III), resultó ser un método rápido y eficiente. Además, pudo realizarse directamente en las muestras parasitadas sin necesidad de su crecimiento en cultivos celulares.

Décima

Se trata del primer estudio realizado en España sobre la caracterización de cepas de *Toxoplasma*. En las procedentes de animales domésticos se demostró la presencia de los tres genotipos, siendo el genotipo II el más prevalente, mientras que en las cepas procedentes de humanos, se demostró la presencia de los tres genotipos en similar proporción.

RESUMEN

Se ha llevado a cabo el desarrollo de técnicas de ADN para el diagnóstico y caracterización de *Toxoplasma gondii*. Para ello se ha estudiado la aplicación de las técnicas moleculares para el diagnóstico por medio de la detección del parásito en diversos tipos de muestras procedentes de los pacientes incluidos en los principales grupos de riesgo que se ven afectados por la enfermedad. La alta especificidad y sensibilidad obtenida con la PCR secuencial interna mediante la amplificación del gen B1, tanto en muestras experimentales como clínicas, permitió destacar esta técnica en el diagnóstico de la toxoplasmosis. La aplicación de la técnica de PCR permitió el diagnóstico de la toxoplasmosis en los pacientes incluidos en los principales grupos de riesgo (SIDA, inmunodeprimidos, inmunocompetentes, gestantes y neonatos). La selección de las muestras más adecuadas, según los cuadros clínicos, permitió la obtención de mejores resultados. Se observó que la sensibilidad del diagnóstico por PCR se incrementa combinando el estudio de diferentes tipos de muestras y analizando muestras secuenciales.

Se realizó el estudio epidemiológico de la toxoplasmosis gestacional en el área de Madrid, determinando la seroprevalencia, incidencia y las principales variables epidemiológicas implicadas, con el fin de conocer la prevalencia de la enfermedad en este entorno. Se observó una seroprevalencia del 25,4%, mostrando un descenso importante en la última década.. Los factores de riesgo asociados a la infección fueron relacionados con el consumo de carne poco hecha y el contacto con gatos.

La valoración de las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas en este estudio epidemiológico mostró que el estudio rutinario de muestras de sangre y orina de las gestantes por PCR, no resulta de utilidad en la detección de la primoinfección, debido a la parasitemia transitoria en personas inmunocompetentes, aunque si es interesante esta técnica en líquido amniótico. Se comprobó que la detección de la primoinfección en gestantes, mediante el diagnóstico serológico, a falta de una seroconversión que marque de forma concreta el momento de infección, necesita el estudio en conjunto de diferentes marcadores serológicos, siendo de gran interés el índice de avidéz de IgG, pero no como prueba única.

Se realizó la caracterización genómica de diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*, siendo el primer estudio realizado en España con cepas autóctonas, de origen animal y humano. El genotipado basado en la técnica PCR-RFLP aplicada al gen polimórfico SAG2, demostró la presencia de los tres genotipos predominantes (genotipos I, II, III) de *Toxoplasma*

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acebes, M.V., Diez, B. y Cisterna, R. (1993). *Toxoplasma gondii*. Un reto para los noventa. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 11: 347-351.
- Acebes, M.V., Diez, B., García-Rodríguez, J.A., Viens, P. y Cisterna, R. (1994). Detection of circulating antigens in the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51: 506-511.
- Achbarou, A., Mercereau-Pujalon, O., Autheman, J.M., Fortier, B., Camus, D. y Dubremetz, J.F. (1991). Characterisation of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47: 223-233.
- Ades, A.E. (1991). Evaluating the sensitivity and predictive value of tests of recent infection: toxoplasmosis in pregnancy. *Epidemiol. Infect.*, 107: 527-535.
- Allain, J.P., Palmer, C.R. y Pearson, G. (1998). Epidemiological study of latent and recent infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women from a regional population in the U.K. *J. Infect.*, 36: 189-196.
- Alonso, A., Quintanilla Gozalo, A., Rodríguez, M., Pereira-Bueno, J., Ortega-Mora, L.M. y Miró, G. (1997). Seroprevalencia de la infección por *Toxoplasma gondii* en gatos vagabundos en el área de Madrid. *Act. Paras. Portug.*, 4: 12.
- Ambroise-Thomas, P. y Okay, T. (1993). Variations inter et intra-cepales de pathogenicité, chez *Toxoplasma gondii*. Consequences cliniques et épidémiologiques. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 177: 1411-1421.
- Anadoko, M.O., Joyson, D.H. y Payne, R.A. (1992). The prevalence of toxoplasma infection among pregnant women in Ibadan, Nigeria. *J. Trop. Med. Hyg.*, 95: 143-145.
- Andresen, K., Ibrahim, M.E., Theander, T.G. y Kharazmi, A. (1996). Random amplification polymorphic DNA for the differentiation of *Leishmania donovani* isolates from Sudan. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 204-205.
- Angel, S., Maero, E., Blanco, J.C., Pzsenny, V., Zala, C., Gonzalez, R., Perelmutter, H. y Garberi, J.C. (1992). Early diagnosis of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients by dot blot hybridization analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 3286-3287.
- Angel, S., Matrajt, M., Margarit, J., Nigro, M., Illescas, E., Pzsenny, V., Amendeira, M.R.R., Guarnera, E. y Garberi, J.C. (1997). Screening for active toxoplasmosis in patients by DNA hybridization with the ABGTg7 probe in blood samples. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 591-595.
- Antinori, A., Ammassari, A., De Luca, A., Cingolani, A., Murri, R., Scoppettuolo, G., Fortini, M., Tartaglione, T., Larocca, L.M., Zannoni, G., Cattani, P., Grillo, R., Roselli, R., Iacoangeli, M., Scerrati, M. y Ortona, L. (1997). Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *Neurology*, 48: 687-694.
- Aouizerate, F., Cazenave, J., Poirier, L., Verin, P., Cheyrou, A., Begueret, J. y Lagoutte, F. (1999). Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor by the polymerase chain reaction. *Ophthalmol.*, 77: 107-109.
- Araujo, F.G., Slifer, T. y Kim, S. (1997). Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *J. Parasitol.*, 83: 521-522.
- Arcavi, M., Orfus, G. y Griemberg, G. (1997). Diagnosis of Toxoplasmosis by joint detection of immunoglobulin A and immunoglobulin M. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 1450-1453.

- Arnold, S.J., Kinney, M.C., Mc Cormick, M.S., Dummer, S. y Scott, M.A. (1997). Disseminated toxoplasmosis. Unusual presentations in the immunocompromised host. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, 121: 869-873.
- Asai, T., O'Sullivan, W.J. y Tatibana, M. (1983). A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.*, 258: 6816-6822.
- Asensi, V., Carton, J.A., Maradona, J.A., Oña, M. y Arribas, J.M. (1993). Clinical value of blood cultures for detection of *Toxoplasma gondii* in human immunodeficiency virus-seropositive patients with and without cerebral lesions on computerized tomography. *CID*, 17: 511-512.
- Asensi, V., Carton, J.A., Maradona, J.A., Oña, M., Melón, S., Asensi, J.M., Martínez, A., Tuya, M.J. y Arribas, J.M. (1993). Toxoplasmosis pulmonar. Estudio de 4 casos y revisión de la literatura. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.*, 11: 195-198.
- Asensi, V., Carton, J.A., Maradona, J.A., Oña, M., Melon, S., Martínez, A., Asensi, J.M., Villar, H., Méndez, F.J. y Arribas, J.M. (1993). Significado clínico del cultivo de *Toxoplasma gondii* en sangre y en otros medios orgánicos. *Med.Clin.*, 100: 651-654.
- Ashburn, D. (1992). History and general epidemiology. In: Human toxoplasmosis, edited by Ho-Yen, D.O. and Joss, A.W.L. New York: Oxford University Press, p. 1-22.
- Bacigalupo, M.A., Bazzini, P., Farina, L. y Ius, A. (1996). Evaluation of three immunoassays for detection of Toxoplasma-specific immunoglobulin G and M. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.*, 34: 503-505.
- Bader, T.J., Macones, G.A. y Asch, D.A. (1997). Prenatal screening for toxoplasmosis. *Obstetrics Gynecology*, 90: 457-464.
- Barker, D.C., Butcher, J., Gibson, L.J. y Williams, R.H. (1986). Characterization of *Leishmania* sp. by DNA hybridization probes, *UNDP/World Bank/WHO/TDR*, pp: 1-57.
- Barker, K.F. y Holliman, R.E. (1992). Laboratory techniques in the investigation of toxoplasmosis. *Genitourin. Med.*, 68: 55-59.
- Bauer H.M., Yi Ting M.S., Greer C.E., Chambers J.C., Tashiro C.J., Chimera J., Reingold A. y Manos M. (1991). Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*, 265: 472-477.
- Beaman, M.H., McCabe, R.E., Wong, S.Y. and Remington, J.S. (1995). *Toxoplasma gondii*. In: Principles and practice of infectious diseases, edited by Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. New York: Churchill Livingstone Inc., p. 2455-2472.
- Belkum, A. (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin.Microbiol.Rev.*, 7: 174-184.
- Bell, J. (1989). The polymerase chain reaction. *Immun.Today*, 10: 351-355.
- Benenson, M.W., Takafuji, E.T., Lemon, S.M., Greenop, R.L. y Sulzer, A.J. (1982). Oocyst transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N.Engl.J.Med.*, 307: 666-669.
- Benítez, A.M., del Castillo, F., Salas, S., San José, M.A. y Martínez-Zapico, R. (1998). Valor de los anticuerpos IgM anti-toxoplasma durante la gestación. *Clin. Invest. Gin. Obst.*, 25: 107-110.
- Berens, R.L., Krug, E.C., Nash, P.B. y Curiel, T.J. (1998). Selection and characterization of *Toxoplasma gondii* mutants resistant to artemisinin. *JID*, 177: 1128-1131.
- Berrebi, A. y Kobuch, W.E. (1994). Toxoplasmosis in pregnancy. *Lancet*, 344: 950.

- Besnier, J.M., Verdier, M., Cotty, F., Fatissof, F., Besancenez, A. y Choutet, P. (1995). Toxoplasmosis of the bladder in a patient with AIDS. *CID*, 21: 452-454.
- Beverley, J.K. y Machkay, R.R. (1962). Ovine abortion and toxoplasmosis in the east Midlands. *Vet. Rec.*, 74: 499-501.
- Beverley, J.K. y Watson, W.A. (1961). Ovine abortion and toxoplasmosis in Yorkshire. *Vet. Rec.*, 73: 5-10.
- Beverley, J.K., Watson, W.A. y Payne, J.M. (1971). The pathology of the placenta in ovine abortion due to toxoplasmosis. *Vet. Rec.*, 88: 124-128.
- Blanc-Jouvan, M., Boibieux, A., Fleury, J., Fourcade, N., Gandilhon, F., Dupouy-Camet, J., Peyron, F. y Ducerf, C. (1996). Chorioretinitis following liver transplantation: detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. *CID*, 22: 184-185.
- Blanche, P., Robert, F., Dupouy-Camet, J. y Sicard, D. (1994). Toxoplasmosis-associated hemophagocytic syndrome in a patient with AIDS: diagnosis by the polymerase chain reaction. *CID*, 19: 989-990.
- Blanco, J.C., Angel, S., Maero, E., Pzsenny, V., Serpente, P. y Garberi, J.C. (1992). Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 46: 350-357.
- Bobic, B., Jevremovic, I., Marinkovic, J., Sibalic, D. y Djurkovic-Djakovic, O. (1998). Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Europ. J. Epidem.*, 14: 605-610.
- Bogliolo, A.R. y Godfrey, D.G. (1987). Isoenzymes changes during the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 222-229.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D.J.P. y Heesemann, J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii* related to gene encoding small heat-shock proteins of plants. *Molecular Microbiology*, 16: 1221-1230.
- Bonhomme, A., Pingret, L. y Pinon, J.M. (1992). Review: *Toxoplasma gondii* cellular invasion. *Parassitologia*, 34: 31-43.
- Bonhomme, A., Bouchot, A., Pezzella, N., Lemoal, H., Gómez-Marín, J.E. and Pinon, J.M. 1998, Mecanismos de señalización intracelular durante el proceso invasivo de *Toxoplasma gondii*. In: Memorias II Congreso Internacional de Toxoplasmosis, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sanchez, N. Santa Fe de Bogota: Universidad de los Andes, p. 137-143.
- Bretagne, S., Costa, J.M., Vidaud, M., Tran Van Nhieu, J. y Fleury-Feith, J. (1993). Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *JID*, 168: 1585-1588.
- Bretagne, S., Costa, J.M., Fleury-Feith, J., Poron, F., Dubreuil-Lemaire, M.L. y Vidaud, M. (1995a). Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of Toxoplasmosis in AIDS patients. *J.Clin.Microbiol.*, 33: 1662-1664.
- Bretagne, S., Costa, J.M., Kuentz, M., Simon, D., Vidaud, M., Fortel, I., Vernant, J.P. y Cordonnier, C. (1995b). Late toxoplasmosis evidenced by PCR in a marrow transplant recipient. *BMT*, 15: 809-811.
- Brindley, P.J., Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., Davis, W., Dubey, J.P., Belfort, R., Martins, M.C., Silveira, C., Jamra, L., Waters, A.P. y Sher, A. (1993). Differentiation of *Toxoplasma gondii* closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 48: 447-456.

- Brinkman, K., Debast, S., Sauerwein, R., Ooyman, F., Hiel, J. y Raemaekers, J. (1998). Toxoplasma retinitis/encephalitis 9 months after allogeneic bone marrow transplantation. *BMT*, 21: 635-636.
- Broadbent, E.J., Roos, R. y Hurley, R. (1981). Screening for toxoplasmosis in pregnancy. *J.Clin.Pathol.*, 34: 659-664.
- Bruijn, M.H.L. (1998). Diagnostic DNA amplification no respite for the elusive parasite. *Parasitology Today*, 10: 293-295.
- Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L. y Boothroyd, J. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J.Immunol.*, 141: 3584-3591.
- Burg, J.L., Grober, C.M., Pouletty, P. y Boothroyd, J. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.*, 27: 1787-1792.
- Calicó, I., Juste, C., Arcalís, L., Morales Sánchez, M. y Castillo Salinas, F. (1990). Toxoplasmosis diagnosticada mediante métodos virológicos. *Enfer.Infecc.Microbiol.Clin.*, 8: 392-393.
- Caramello, P., Forno, B., Lucchini, A., Pollono, A.M., Sinicco, A. y Gioannini, P. (1993). Meningoencephalitis caused by *Toxoplasma gondii* diagnosed by isolation from cerebrospinal fluid in an HIV-positive patient. *Scand.J.Infect.Dis.*, 25: 663-666.
- Cazenave, J., Cheyrou, A., Blouin, P., Johnson, A.M. y Begueret, J. (1991). Use of polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma*. *J.Clin.Pathol.*, 44: 1037-1039.
- Center for Disease Control (1979). Serology of Toxoplasmosis, Public Health Service, of Center for Disease Control, Atlanta.pp. 1-53.
- Cesbron-Delauw, M.F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Today*, 10: 293-296.
- Cesbron-Delauw, M.F., Tomavo, S., Beauchamps, P., Fourmaux, M.P., Camus, D., Capron, A. y Dubremetz, J.F. (1994). Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.*, 269: 16217-16222.
- Chaisson, R.E., Gallant, J.E., Keruly, J.C. y Moore, R.D. (1998). Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *AIDS*, 12: 29-33.
- Chan, C.C., Palestine, A.G., Li, Q. y Nussenblatt, R.B. (1994). Diagnosis of ocular toxoplasmosis by the use of immunocytology and the polymerase chain reaction. *Am.J.Ophthalmol.*, 117: 803-805.
- Chandrasekar, P.H. y Momin, F. (1997). Disseminated toxoplasmosis in marrow recipients: a report of three cases and a review of the literature. Bone marrow transplant team. *BMT*, 19: 685-689.
- Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M.F. y Capron, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterisation and localisation of antigens secreted from tachyzoites. *Ex.Parasit.*, 71: 114-124.
- Chatterton, J.M.W. 1992, Pregnancy. In: Human toxoplasmosis, edited by Ho-Yen, D.O. and Joss, A.W.L. Oxford: Oxford University Press, p. 144-183.
- Choi, W.Y., Nam, H.W., Kwak, N.H., Huh, W., Kim, Y.R., Kang, M.W., Cho, S.Y. y Dubey, J.P. (1997). Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *JID*, 175: 1280-1282.

- Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J. y Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research*, 20: 1717-1723.
- Chuchana, P. (1992). Reactions de polymerisation en chaine: methodologie generale. *Ann.Biol. Clin.*, 50: 703-708.
- Cingolani, A., De Luca, A., Ammassari, A., Murri, R., Linzalone, A., Grillo, R. y Antinori, A. (1996). PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *J.Med.Microbiol.*, 45: 472-476.
- Contini, C., Romani, R., Mango, S. y Delia, S. (1995). Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in AIDS patients by a tissue-culture technique. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 14: 434-440.
- Contreras, M., Schenone, H., Salinas, P., Sandoval, L., Rojas, A., Villarroel, F. y Solis, F. (1996). Seroepidmiology of human toxoplasmosis in Chile. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, 38: 431-435.
- Cornelissen, A.W., Overdulve, J.P. y Van der Ploeg, M. (1984). Determination of nuclear DNA of five Eucoccidian parasites, *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I.(T.) gondii*. *Parasit.*, 88: 531-553.
- Costa, J.M., Dard, M.L., Assouline, B., Vidaud, M. y Bretagne, S. (1997). Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 2542-2545.
- Cour, M.I., Lopez Bartolome, O., Garcia-Lerin, M.C., Ferro, A., Martin, M. y Hernandez, J.C. (1988). Brote de toxoplasmosis. *Enfer.Infecc.Microbiol.Clin.*, 6: 330-331.
- Couvreux, J., Sadak, A., Fortier, B. y Dubremetz, J.F. (1988). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasit.*, 97: 1-10.
- Cristina, N., Liaud, M.F., Santoro, F., Oury, B. y Ambroise-Thomas, P. (1991a). A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. *Ex.Parasit.*, 73: 73-81.
- Cristina, N., Oury, B., Ambroise-Thomas, P. y Santoro, F. (1991b). Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitology Research*, 77: 266-268.
- Cristina, N., Dardé, M.L., Boudin, C., Tavernier, G., Pestre-Alexandre, M. y Ambroise-Thomas, P. (1995). A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitology Research*, 81: 32-37.
- Cuturic, M., Hayat, G.R., Vogler, C.A. y Velasques, A. (1997). Toxoplasmic polymyositis revised: case report and review of literatur. *Neuromuscul. Disord.*, 7: 390-396.
- Dannemann, B.R., Vaughan, W.C. y Thulliez, P. (1990). Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J.Clin.Microbiol.*, 28: 1928-1933.
- Dannemann, B.R., Israelski, D.M. y Leoung, G.S. (1991). Toxoplasma serology, parasitemia and antigenemia in patients at risk for toxoplasmosis. *AIDS*, 5: 1363-1365.
- Dardé, M.L., Bouteille, B. y Pestre-Alexandre, M. (1987). Differentiation iso-enzymatique de 7 souches de *Toxoplasma gondii* par iso-electrofocalisation en gel de polyacrylamide. *Bull.Soc. Fran.Parasit.*, 5: 33-39.
- Dardé, M.L., Bouteille, B. y Pestre-Alexandre, M. (1988a). Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 39: 551-558.

- Dardé, M.L., Bouteille, B. y Pestre-Alexandre, M. (1988b). Analyse iso-enzymatique de souches clonées de *Toxoplasma gondii*. *Bull. Soc. Fran. Parasit.*, 6: 41-46.
- Dardé, M.L., Bouteille, B. y Pestre-Alexandre, M. (1990). Comparison of isoenzyme profiles of *Toxoplasma gondii* tachyzoites produced under different culture conditions. *Parasitology Research*, 76: 367-371.
- Dardé, M.L., Bouteille, B. y Pestre-Alexandre, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implicatios. *J.Parasitol.*, 78: 786-794.
- Davidson, M.M. 1992, New techniques. In: Human Toxoplasmosis, edited by Ho-Yen, D.O. and Joss, A.W.L. Oxford: Oxford Medical Publications, p. 205-231.
- Dawkins, H.J.S. (1989). Large DNA separation using field alternation agar gel electrophoresis. *J.Chromatography*, 492: 615-639.
- De Boer, J.H., Verhagen, C., Bruinenberg, M., Rothova, A., de Jong, P.T., Baarsma, G.S., Van der Lelij, A., Ooyman, F., Bollemeijer, J.G., Derhaag, P.J. y Kijlstra, A. (1996). Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *Am.J. Ophthalmol.*, 121: 650-658.
- De Champs, C., Pelloux, H., Dechelotte, P., Giraud, J.C., Bally, N. y Ambroise-Thomas, P. (1998). *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: inoculum and age effects. *Parasite*, 5: 215-218.
- Decalavas, J. y Papetropoulo, M. (1990). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in gravidas and recently aborted women and study of risk factors. *Eur.J.Epidemiol.*, 6: 223-226.
- Decoster, A., Slizewicz, B., Simon, J., Bazin, C., Darcy, F., Vittu, G., Boulanger, C., Champeau, Y., Demori, J.L., Duhamel, M. y Capron, A. (1991). Platelia-Toxo IgA, a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies. *J.Clin.Microbiol.*, 29: 2291-2295.
- Del Castillo, F. y Herruzo, R. (1998). Factores de riesgo de toxoplasmosis en el niño. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.*, 16: 224-229.
- Derouin, F., Mazon, M.C. y Garin, Y.J.F. (1987). Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J.Clin.Microbiol.*, 25: 1597-1600.
- Desmonts, G. y Remington, J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *J.Clin.Microbiol.*, 11: 562-568.
- Desmonts, G., Forestier, F., Thulliez, Ph., Daffos, F., Capella-Pavlovsky, M. y Chartier, M. (1985). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet*, ii: 500-504.
- Dietz, H.H., Henriksen, P., Bille-Hansen y Henriksen, S.A. (1997). Toxoplasmosis in a colony of New World monkeys. *Vet. Paras.*, 68: 299-304.
- Diez, B., Nicolas, R., Cisterna, R. y Cañavate, M.L. (1991). Kinetics and regulation of NK activity by interleukin-2 and interferon in acute toxoplasmosis. *Scand.J.Infect.Dis.*, 34: 673-677.
- DiGiacomo, R.F., Harris, N.V., Huber, N.L. y Cooney, M.K. (1990). Animal exposures and antibodies to *Toxoplasma gondii* in a university population. *Am.J. Epidemiol.*, 131: 729-733.
- Dirie, M.F., Murphy, N.B. y Gardiner, P.R. (1993). DNA fingerprinting of *Trypanosoma* isolates rapidly identifies intraspecific relationships. *J.Eukar. Microb.*, 40: 49-56.

- Domingo, C.J. (1996). Toxoplasmosis. Prevalencia. Interpretación diagnóstica serológica. Persistencia de IgM, Tesis doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
- Domingo, C.J., Echevarría, C., Rodríguez, M. y Lozano, A. (1991). Interpretación de resultados de la toxoplasmosis en el embarazo y recién nacido: ese gran problema. *BES*, 1927: 409-410.
- Dubey, J.P. (1990). Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. *J.Amer. Vet Med.Assoc.*, 196: 259-262.
- Dubey, J.P. (1995). Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J.Parasitol.*, 81: 410-415.
- Dubey, J.P. (1996). Infectivity and patogenicity of *Toxoplasma gondii* oocyst for cats. *J.Parasitol.*, 82: 957-961.
- Dubey, J.P. (1997). Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0,85-6% NaCl solutions at 4-20°C. *J.Parasitol.*, 83: 946-949.
- Dubey, J.P. (1998a). Diagnostico y prevencion del aborto toxoplasmico en animales. In: Toxoplasmosis. *Memorias del II Congreso Internacional*, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogota: Universidad de Los Andes, p. 57-60.
- Dubey, J.P. (1998b). Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en animales. In: Toxoplasmosis. *Memorias del II Congreso Internacional*, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogota: Universidad de los Andes, p. 137-143.
- Dubey, J.P. (1998c). Toxoplasmosis en animales para carne y de zoológico. In: Toxoplasmosis. *Memorias del II Congreso Internacional*, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogota: Universidad de los Andes, p. 51-56.
- Dubey, J.P. (1998d). Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasit.*, 116: 43-50.
- Dubey, J.P. y Frenkel, J.K. (1972). Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 19: 155-177.
- Dubey, J.P. y Frenkel, J.K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cyst. *J. Protozool.*, 23: 537-546.
- Dubey, J.P. y Thayer, D.W. (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J.Parasitol.*, 80: 764-767.
- Dubey, J.P., Weigel, R.M., Siegel, A.M., Thulliez, P., Kitron, U.D., Mitchell, M.A., Mannelli, A., Mateus-Pinilla, N.E., Shen, S.K., Kwok, O.C.H. y Todd, K.S. (1995). Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J.Parasitol.*, 81: 723-729.
- Dubey, J.P., Thayer, D.W., Speer, C.A. y Shen, S.K. (1998). Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int.J.Parasitol.*, 28: 369-375.
- Dupon, M., Cazenave, J., Pellegrin, J.L., Ragnaud, J.M., Cheyrou, A., Fischer, I., Leng, B. y Lacut, J.Y. (1995). Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J.Clin.Microbiol.*, 33: 2421-2426.
- Dupouy-Camet, J., Lavareda de Souza, S., Maslo, C., Paugman, A., Saimot, A.G., Benarous, R., Tourte-Schaefer, C. y Derouin, F. (1993). Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 1866-1869.

- Eggers, C., Grob, U., Klinker, H., Schalke, B., Stellbrink, H.J. y Kunze, K. (1995). Limited value of cerebrospinal fluid for direct detection of *Toxoplasma gondii* in toxoplasmic encephalitis associated with AIDS. *J. Neurol.*, 242: 644-649.
- Elsaid, M.M., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G.L. y Vitor, R.W.A. (1995). Diagnosis of human toxoplasmosis by a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev.Inst.Med.Trop. Sao Paulo*, 37: 117-122.
- Endo, T., Yagita, K., Yasuda, T. y Nakamura, T. (1988). Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii* host cell. *Parasitol. Res.*, 75: 102-106.
- Erich, H.A. (1989). PCR technology: principles and applications for DNA amplification, Stockton Press, Nueva York.
- Erich, H.A. (1990). Basic Methodology. In: PCR Technology, edited by Erlich, H.A. N.Y.: M. Stockton press., p. 1-16.
- Erich, H.A., Gelfand, D.H. y Sninsky, J.J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 25: 1643-1650.
- Evans, R. (1992). Life cycle and animal infection. In: Human Toxoplasmosis, edited by Ho-Yen, D.O. and Joss, A.W.L. New York: Oxford University Press, p. 26-50.
- Ferguson, D.J.P., Huskinson-Mark, J., Araujo F.G. y Remington, J. (1994). A morfological study of chronic cerebral toxoplasmosis in mice: Comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.*, 80: 493-501.
- Ferguson, D.J.P. y Hutchinson, W.M. (1987). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.*, 73: 483-491.
- Foudrinier, F., Aubert, D., Puygauthier-Toubas, D., Rouger, C., Beguinot, I. y Halbout, P. (1996). Detection of *Toxoplasma gondii* in immunodeficient subjects by gene amplification: Influence of therapeutics. *Scand.J. Infect.Dis*, 28: 383-386.
- Filice, G.A., Yeager, A.S. y Remington, J.S. (1980). Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. *J.Clin.Microbiol.*, 12: 336-342.
- Filice, G.A., Hitt, J.A., Mitchell, C.D., Blackstad, M. y Sorensen, S.W. (1993). Diagnosis of *Toxoplasma* parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polimerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 2327-2331.
- Forestier, F., Daffos, F., Hohlfeld, P. y Lynch, L. (1991). Les foetopathies infectieuses pr,vention, diagnostic pr,natal, attitude pratique. *Presse Med.*, 20: 1448-1454.
- Forestier, F., Hohlfeld, P., Sole, Y. y Daffos, F. (1998). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR: extended experience. *Prenat. Diagn.*, 18: 405-415.
- Foudrinier, F., Marx-Chemla, C., Aubert, D., Bonhomme, A. y Pinon, J.M. (1995). Value of specific immunoglobulin A detection by two immunocapture assay in the diagnosis of toxoplasmosis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 14: 585-590.
- Foussard, F., Gallois, Y.E., Tronchin, G., Robert, R. y Mauras, G. (1990). Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. *Parasitology Research*, 76: 563-565.
- Filice, G.A., Yeager, A.S. y Remington, J.S. (1980). Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. *J.Clin.Microbiol.*, 12: 336-342.

- Francis, J.M. y Joynson, H.M. (1993). Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 12: 556-559.
- Franzen, C., Altfeld, M., Hegener, P., Hartmann, P., Arendt, G., Jablonowski, H., Rockstroh, J., Diehl, V., Salzberger, B. y Finkenheuer, G. (1997). Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 2639-2641.
- Frenkel, J.K. (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitology Today*, 4: 273-278.
- Frenkel, J.K. (1995). Prevention of *Toxoplasma* infection in pregnant women and their fetus. *CID*, 20: 727-728.
- Frenkel, J.K. (1996). The stage-conversion time of *Toxoplasma gondii*: interpretation of chemical-biologic data out of parasitologic or host context. *Parasitol Res*, 82: 656-658.
- Frenkel, J.K. (1998a). Epidemiología de la infección por *Toxoplasma* en humanos. In: *Toxoplasmosis. II Congreso Internacional de Toxoplasmosis*, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogotá: Universidad de Los Andes, p. 81-97.
- Frenkel, J.K. (1998b). Prevención de la transmisión de la toxoplasmosis en el embarazo: medidas higiénicas y vacunación. *II Congreso Internacional de Toxoplasmosis*, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogotá: Universidad de Los Andes, p. 66-73.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P. y Miller, N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167: 893-896.
- Frenkel, J.K., Ruiz, A. y Chinchilla, M. (1975). Soil survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 24: 439-443.
- Frenkel, J.K. y Ambrose-Thomas, P. (1997). Genomic drift of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.*, 83: 1-5.
- Freyre, A. 1998, Los ciclos de toxoplasma inducidos por infección con carne y con ooquistes. In: *Memorias II Congreso Internacional de Toxoplasmosis*, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogotá: Universidad de los Andes, p. 1-6.
- Fuentes, I., Rodríguez, M., Domingo, C.J., del Castillo, F., Juncosa, T. y Alvar, J. (1996). Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 2368-2371.
- Gallino, A., Maggiorini, M., Kiowski, W., Martin, X., Wunderli, W., Schneider, J., Turina, M. y Follath, F. (1996). Toxoplasmosis in heart transplant recipients. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 15: 389-393.
- Gárate, T. y Alvar, J. (1993). Técnicas de DNA aplicadas al diagnóstico de las enfermedades parasitarias. In: *Parasitología molecular*, edited by Rivas Lopez, L. and López López, M.C. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, p. 373-396.
- Garly, M., Petersen, E., Pedersen, C., Lundgren, J.D. y Gerstoft, J. (1997). Toxoplasmosis in Danish AIDS patients. *Scand.J.Infect.Dis.*, 29: 597-600.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Müller, W., Trinchieri, G. y Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL12, IFN γ and TNF α . *J.Immunol.*, 157: 798-805.
- Geissmann, F., Derouin, F., Marolleau, J.P., Gisselbrecht, C. y Brice, P. (1994). Disseminated toxoplasmosis following autologous bone marrow transplantation. *CID*, 19: 800-801.

- Gillo, B. y Desmonts, G.N. (1961). Diagnostic serologique de la toxoplasmose. Essai d'application aux animaux de boucherie. *Rev. Med. Vet.*, 136: 383-389.
- Gómez-Marín, J., Valere, A., Bonhomme, A., El Btaouri, H., Antonicelli, F., Burlet, H., Aubert, D., Villena, I., Guenounou, M., Haye, B. y Pinon, J.M. (1998a). Interferon- signal transduction during parasite infection: modulation of MAP kinases in the infection of human monocyte cells (THP1) by *Toxoplasma gondii*. *Paras. Immunol.*, 20: 631-635.
- Gómez-Marín, J.E., Bonhomme, A., Guenounou, M., y col. (1998b). Citoquinas y quinasas de proteínas durante el proceso infeccioso de *Toxoplasma gondii*. In: Memorias II Congreso Internacional de Toxoplasmosis, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogotá: Universidad delos Andes, p. 61-65.
- Gofii, O. (1997). Detección de *Toxoplasma gondii*: Comparación de la amplificación genética y la detección de antígenos en una toxoplasmosis encefálica experimental. Tesis Doctoral.
- Gordon, M.A., Duncan, R.A. y Kingsley, L.C. (1981). Automated immuno-fluorescence test for toxoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.*, 13: 283-285.
- Grimwood, J. y Smith, J.E. (1992). *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Ex.Parasit.*, 74: 106-111.
- Grob, U., Roggenkamp, A., Janitschke, K. y Heesemann, J. (1992). Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 11: 33-39.
- Gross, U. (1996). *Toxoplasma gondii* research in Europe. *Parasitology Today*, 12: 1-4.
- Gross, U., Bohne, W., Soete, M. y Dubremetz, J.F. (1996). Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Today*, 12: 30-33.
- Gross, U., Kempf, M.C., Seeber, F., Luder, C.G.K., Lugert, R. y Bohne, W. (1997). Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite?. *Behring Inst.Mitt.*, 99: 97-106.
- Gross, U., Muller, W., Knapp, S. y Heesemann, J. (1991). Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. *Infect. Immuni.*, 59: 4511-4516.
- Grover, C.M., Thulliez, P., Remington, J.S. y Boothroyd, J.C. (1990). Rapid prenatal diagnosis of congenital toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J.Clin.Microbiol.*, 28: 2297-2301.
- Guay, J.M., Dubois, D., Morency, M.J., Gagnon, S., Mercier, J. y Levesque, R.C. (1993). Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using multiplex polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 203-207.
- Guerra-Garcia, C. y Fernandez-Sampedro, J. (1995). Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en mujeres embarazadas. *Aten. Primaria*, 16: 151-153.
- Guo, Z.G. y Johnson, A.M. (1995a). Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 81: 365-370.
- Guo, Z.G. y Johnson, A.M. (1995b). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strain by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasit.*, 111: 127-132.
- Guo, Z.G. y Johnson, A.M. (1996). DNA polymorphisms associated with murine virulence of *Toxoplasma gondii* identified by RAPD-PCR. *J Biol Chem*, 17-26.

- Guo, Z.G., Gross, U. y Johnson, A.M. (1997). *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 83: 458-463.
- Gutierrez, J., Rodríguez, M., Piédrola, G. y Maroto, M.C. (1997). Detection of IgA and low-avidity IgG antibodies for the diagnosis of recent active toxoplasmosis. *Clin.Microbiol.Infec.*, 3: 658-662.
- Guy, E.C. y Joynson, H.M. (1995). Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *JID*, 172: 319-322.
- Guy, E.C., Pelloux, H., Lappalainen, M., Aspöck, H., Hahl, A., Melby, K.K., Holberg-Petersen, M., Petersen, E., Simon, J. y Ambroise-Thomas, P. (1996). Interlaboratory comparison of polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA added to samples of amniotic fluid. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 15: 836-839.
- Hakes, T.B. y Armstrong, D. (1983). Toxoplasmosis. Problems in diagnosis and treatment. *Cancer*, 52: 1535-1540.
- Hall, S.M. (1992). Congenital toxoplasmosis. *BMJ*, 305: 291-297.
- Hall, S.M. (1994). Screening for toxoplasmosis. *BMJ*, 309: 665.
- Hartup, C., Johnson, J.D. y Holliman, R.E. (1997). The investigation of toxoplasma infection associated with pregnancy. *J.Infect*, 35: 47-54.
- Hashemi-Fesharki, R. (1996). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. *Vet.Paras.*, 61: 1-3.
- Hedman, K., Lappalainen, M., Seppei, I. y Mekele, O. (1989). Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. *JID*, 159: 736-740.
- Hedman, K., Vaheri, A. y Brummer-Korvenkontio, M. (1991). Rapid diagnosis of hantavirus disease with an IgG-avidity assay. *Lancet*, 338: 1353-1356.
- Hedman, K., Lappalainen, M., Suderlund, M. y Hedman, L. (1993). Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Microbiology*, 4: 123-129.
- Hehl, A., Manger, I.D. y Boothroyd, J.C. (1997). Genetic analysis in *Toxoplasma*: gene discovery with expressed sequence tags and rapid mapping of natural polymorphisms. *Methods*, 13: 89-102.
- Hellerbrand, C., Goebel, F.D. y Disko, R. (1996). High predictive value of *Toxoplasma gondii* IgG antibody levels in HIV-infected patients for diagnosis of cerebral toxoplasmosis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 15: 869-872.
- Herion, P., Hernandez-Pardo, R., Dubremetz, J.F. y Saavedra, R. (1993). Subcellular localisation of the 54 kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. *J.Parasitol.*, 79: 216-222.
- Hezard, N., Marx-Chemla, C., Foudrinier, F., Villena, I., Querreux, C., Leroux, B., Dupouy, D., Talmud, M. y Pinon, J.M. (1997). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in 261 pregnancies. *Prenat.Diagn.*, 17: 1047-1054.
- Higuero, A., Alvaro, M.A., Andrés, M.J. y Escudero, R.M. (1991). Estado inmunitario frente a *Toxoplasma* en la población gestante de Valladolid. *Aten.Primaria*, 4: 96.
- Hitt, J.A. y Filice, G.A. (1992). Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *J.Clin.Microbiol.*, 30: 3181-3184.
- Ho-yen, D.O. (1992a). Clinical features, Oxford University Press, New York. pp. 57-78.

- Ho-yen, D.O. (1992b). Immunocompromised patients. In: Human toxoplasmosis, edited by Ho-Yen, D.O. and Joss, A.W.L. Oxford: Oxford University Press, p. 185-201.
- Ho-yen, D.O., Joss, A.W.L., Balfour, A.H., Smyth, E.T.M., Baird, D. y Chatterton, J.M.W. (1992). Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. *J.Clin.Pathol.*, 45: 910-913.
- Hofgertner, W.T., Swanzy, S.R., Bacina, R.M., Condon, J., Gupta, M., Matlock, P.E., Bergeron, D.L., Plorde, J.J. y Fritsche, T.R. (1997). Detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: evaluation of four commercial immunoassay systems. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 3313-3315.
- Hohlfed, P., Daffos, F., Thulliez, P., Aufrant, C., Couvreur, J., MacAleese, J., Descombey, D. y Forestier, F. (1989). Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J. Pediatr.*, 115: 765-769.
- Hohlfeld, P., Daffos, F., Costa, J.M., Thulliez, P., Forestier, F. y Vidaud, M. (1994). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N. Engl.J. Med.*, 331: 695-699.
- Holliman, R.E. (1994). Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. *Serodiagn. Immunother.Infect.Dis.*, 6: 5-16.
- Holliman, R.E., Raymond, R., Renton, N. y Johnson, J.D. (1994). The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. *Epidemiol.Infect.*, 112: 399-408.
- Homan, W.L., Limper, L., Verlaan, M., Borst, A., Vercammen, M. y Van Knapen, F. (1997). Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1 from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitology Research*, 83: 285-289.
- Howe, D.K., Honore, S., Derouin, F. y Sibley, L.D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 1411-1414.
- Howe, D.K. y Sibley, L.D. (1994). *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity. *Ex.Parasit.*, 78: 242-245.
- Howe, D.K. y Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *JID*, 172: 1561-1566.
- Hullman, R. (1990). Serological study of the prevalence of toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Epidemiol.Infect.*, 105: 415-418.
- Hunter, C.A. y Remington, J.S. (1994). Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J.Clin.Microbiol.*, 170: 1057-1067.
- Huskinson, J., Stepick-Biek, P., Araujo, F.G., Thulliez, P., Suzuki, Y. y Remington, J.S. (1989). Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J.Clin.Microbiol.*, 27: 2031-2038.
- Huskinson, J., Stepick-Biek, P. y Remington, J. (1989). Detection of urine during acute toxoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.*, 27: 1099-1101.
- Huskinson, J., Thulliez, P. y Remington, J.S. (1990). Toxoplasma antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies. *J.Clin.Microbiol.*, 28: 2632-2636.
- James, G.S., Sintchenko, V.G., Dickenson, D.J. y Gilbert, G.L. (1996). Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 1572-1575.

- Jensen, L., Heegaard, P.M.H. y Lind, P. (1998). A study of virulence parameters for *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Parasitology Research*, 84: 382-387.
- Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B. y Gundersen, A. (1997). Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 1972-1977.
- Jenum, P.A. y Stray-Pedersen, B. (1998). Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *J.Clin.Microbiol.*, 36: 2907-2913.
- Jenum, P.A., Holberg-Petersen, M., Melby, K.K. y Stray-Pedersen, B. (1998a). Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples. *APMIS*, 106: 680-686.
- Jenum, P.A., Kapperud, G., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., Eskild, A. y Eng, J. (1998b). Prevalence of *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G antibodies among pregnant women in Norway. *Epidemiol.Infect.*, 120: 87-92.
- Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., Kapperud, G., Whitelaw, A., Eskild, A. y Eng, J. (1998c). Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35.940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J.Clin.Microbiol.*, 36: 2900-2906.
- Johnson, A.M. (1997). Speculation on possible life cycle for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. *Parasitology Today*, 13: 393-397.
- Johnson, J.D., Butcher, P.D., Savva, D. y Holliman, R.E. (1993). Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human toxoplasmosis. *J.Infect*, 26: 147-158.
- Joss, A.W.L. (1992). Diagnosis. In: Human toxoplasmosis, edited by Ho-Yen, D.O. and Joss, A.W.L. Oxford: Oxford Medical Publications, p. 79-118.
- Joss, A.W.L., Chatterton, J.M.W., Evans, R. y Ho-yen, D.O. (1993). *Toxoplasma* polymerase chain reaction on experimental blood samples. *J.Med.Microbiol.*, 38: 38-43.
- Joss, A.W.L. y Ho-yen, D.O. (1997). The effects of sample storage on polymerase chain reaction-based detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluids. *J.Med.Microbiol.*, 46: 92-96.
- Joynson, D.H., Payne, R.A. y Rawal, B.K. (1990). Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J.Clin.Pathol.*, 43: 1032-1033.
- Judith B.Weiss (1995). DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin.Microbiol.Rev.*, 8: 113-130.
- Kasper, L.H. y Buzoni-Gatel, D. (1998). Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. *Parasitology Today*, 14: 150-156.
- Kasper, L.H. y Khan, I. (1998). Antigen-specific CD8+ T cells protects against lethal toxoplasmosis in mice infected with *Neospora caninum*. *Infect Immun*, 66: 1554-1560.
- Kerr, K.G. (1994). The rap on REP-PCR-based typing systems. *Reviews in Medical Microbiology*, 5: 233-244.
- Khalifa, K., Roth, A., Roth, B., Arasteh, K.N. y Janitschke, K. (1994). Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral toxoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.*, 32: 2813-2819.
- Khoury, H., Adkins, D., Brown, R., Goodnough, L., Gokden, M., Roberts, T., Stoch, G. y DiPersio, J. (1999). Successful treatment of cerebral toxoplasmosis in a marrow transplant recipient: contribution of a PCR test in diagnosis and early detection. *BMT*, 23: 409-411.

- Kumolosasi, E., Bonhomme, A., Beorchia, A., Foudrinier, F., Marx, C., Pluot, M. y Pinon, J.M. (1996). Kinetics study of the localization and quantitation of target antigens of immunoglobulin a antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. *Parasitology Research*, 82: 402-409.
- Kwok, S. (1990). PCR protocols: a guide to Methods and applications, Academic Press, Inc.pp. 143-145.
- Kwok, S. y Higuchi, R. (1989). Avoid false positives with PCR. *Nature*, 339: 237-238.
- Lafarga, B., Noguera, F.J., Bolaños, M., Pérez, M.C. y Rodríguez, H. (1997). Comportamiento del test de avidéz de IgG en pacientes con enfermedad por citomegalovirus. *Enfer Infecc Microbiol Clin*, 15: 190-195.
- Lappalainen, M., Jokiranta, T.S., Halme, L., Tynnen, O., Lautenschlager, I., Hedman, K., H"ckersedt, K. y Meri, S. (1998). Disseminated toxoplasmosis after liver transplantation: case report and review. *CID*, 27: 1328-1329.
- Lappalainen, M., Koskela, P., Hedman, K., Teramo, K., Ammala, P., Hiilesmaa, V. y Koskiniemi, M. (1992). Incidence of primari toxoplasma infections during pregnancy in Southern Finland: a prospective cohort study. *Scand J Infect Dis*, 24: 97-104.
- Lappalainen, M., Koskela, P., Koskiniemi, M., Ammala, P., Hiilesmaa, V., Teramo, K., Raivio, K.O., Remington, J.S. y Hedman, K. (1993). Toxoplasmosis acquired during prenaney: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *JID*, 167: 691-697.
- Laveran, A. (1900). Au sujet de lih,matozoaire endoglobulaire de Padda oryzivora. *C R Soc Biol*, 52: 19-20.
- Lavrard, I., Chouaid, C., Roux, P., Poirot, J.L., Marteau, M., Lemarchand, B., Meyohas, M.C. y Olivier, J.L. (1995). Pulmonary toxoplasmosis in HIV-infected patients: usefulness of polymerase chain reaction and cell culture. *Eur Respir J.*, 8: 697-700.
- Lazo, J. (1998). Encefalitis en pacientes con SIDA: Diagnóstico diferencial de toxoplasmosis y enfermedad de chagas. In: Memorias II Congreso Internacional de Toxoplasmosis, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sanchez, N. Bogota: Universidad de los Andes, p. 118-136.
- Lebech, M., Joynson, D.H., Seitz, H.M., Thulliez, P., Gilbert, R.E., Dutton, G.N., Ovlisen, B. y Petersen, E. (1996). Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 15: 799-805.
- Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvielle, B., Darcy, F., Lui, J.L., Maes, P., Tartr, A., Capron, A. y Cesbron-Delauw, M.F. (1993). Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorus vacuole membrane. *Mol Biochem Parasitol*, 59: 143-153.
- Leport, C., Raffi, F. y Matheron, S. (1988). Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulfadiazine combination in 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Efficacy of long-term continous therapy. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 84: 94-100.
- Leriche, M.A. y Dubremetz, J.F. (1991). Characterisation of the proteins of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol*, 45: 249-260.
- Letillois, M.F., Laigle, V., Santoro, F., Micoud, M. y Chumpitazi, B.F.F. (1995). *Toxoplasma gondii* surface antigen-1 in sera of HIV-infected patients as an indicator of reactivated toxoplasmosis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 14: 899-903.
- Lew, A.M. (1984). The effect of epitope density and antibody affinity on the ELISA as analysed by monoclonal antibodies. *J.Immunol.Methods*, 72: 171-176.

- Li, L.L., Wartmann, M., Yin, A., Knopf, J.L., Seth, A. y Davis, R.J. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, 72: 269.
- Liesenfeld, O., Press, C., Flanders, R., Ramirz, R. y Remington, J.S. (1996). Study of Abbott Toxo IMx System for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M *Toxoplasma* antibodies: value of confirmatory testing for diagnosis of acute toxoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 2526-2530.
- Liesenfeld, O., Roth, A., Weinke, T., Foss, H.D. y Hahn, H. (1994). A case of disseminated toxoplasmosis-value of PCR for the diagnosis. *J.Infect*, 29: 133-138.
- Lin, S., Ling, Z.C., Zeng, B.C. y Yang, H.Y. (1990). Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in man and animals in Guangdong peoples Republic of China. *Vet Paras*, 34: 357-360.
- Lin, T.M., Halbert, S.P. y O'Connor, G.R. (1980). Standardized quantitative enzyme-linked immunoassay for antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J.Clin.Microbiol.*, 11: 675-681.
- Luft, B.J., Brooks, R.G., Conley, F.K., McCabe, R.E. y Remington, J.S. (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA*, 252: 913-917.
- Luft, B.J., Hafner, R. y Korzun, A.H. (1993). Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 329: 995-1000.
- Luft, B.J., Hafner, R., Korzun, A.H., Leport, C., Antoniskis, D., Boster, E.M., Bourland, D.D., Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J., Morlat, P., Vilde, J.L., Remington, J.S. y y col. (1993). Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 329: 995-1000.
- Luft, B.J. y Remington, J.S. (1988). *Toxoplasma* encephalitis. *JID*, 157: 1-6.
- Luft, B.J. y Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *CID*, 15: 211-222.
- Lumbreras, C., Otero, J.R. y Aguado, J.M. (1997). Prevención de la infección en receptores de transplante de órgano sólido. *Enfer Infecc Microbiol Clin*, 15: 77-89.
- Lumsden (1977). Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Ann. Soc. Belge de Medicine Tropicale*, 57: 361-368.
- Lunden, A., Carlsson, U. y Naslud, K. (1992). Toxoplasmosis and border disease in 54 Swedish floks. Seroprevalence and incidence during one gestation period. *Ac Vet Scand*, 33: 175-184.
- Lunden, A. y Ugglä, A. (1992). Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *Int J Food Microbiol*, 15: 357-363.
- Luton, K., Gleeson, M. y Johnson, A.M. (1999). Ribosomal RNA gene sequence heterogeneity among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol Res*, 81: 310-315.
- Luzon, M., Miro, G. y Quintanilla Gozalo, A. (1997). Epidemiología. *Ovis*, 52: 19-31.
- Lynfield, R. y Eaton, R.B. (1995). Teratogen update: congenital toxoplasmosis. *Teratology*, 52: 176-180.
- Lyons, R.E. y Johnson, A.M. (1995). Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, 17: 353-359.
- Loder, C.G.K. y Gross, U. (1998). Toxoplasmosis: from clinics to basic science. *Parasitology Today*, 14: 43-45.

- Macdonald, R.A., Hosking, C.S. y Jones, C.L. (1988). The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J.Immunol.Methods*, 106: 191-194.
- Mainar, R.C., De la Cruz, C., Asensio, A., Domínguez, L. y Vazquez Boland, J.A. (1996). Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid region, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. *Vet. Res. Commun.*, 20: 153-159.
- Manger, I.D., Hehl, A. y Boothroyd, J.C. (1998a). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.*, 66: 2237-2244.
- Manger, I.D., Hehl, A., Parmley, S.F., Sibley, L.D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R. y Boothroyd, J.C. (1998b). Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect. Immun.*, 66: 1632-1637.
- Marca, M.C., Ramos, J.J., Loste, A., Fernández, A. y Hernández, M. (1996). Prevalencia de la toxoplasmosis ovina en la provincia de Zaragoza. *Med. Vet.*, 13: 503-506.
- Marker, C.L. y Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species-specific patterns. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 45: 753-763.
- Martínez-Fernández, A.R., Fuentes Corripio, I., Rodríguez Ferrer, M. y Domingo Fernández, C.J. (1998). Toxoplasmosis. *Medicine*, 7: 3760-3766.
- Masur, H., Jones, T.C., Lempert, J.A. y Cherubini, T.D. (1978). Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. *American Journal Medicine*, 64: 396-402.
- Mawhorter, S.D., Effron, D., Blinkhorn, R. y Spagnuolo, P.J. (1992). Cutaneous manifestation of toxoplasmosis. *CID*, 14: 1084-1088.
- McAuley, J., Boyer, K.M., Patel, D., Mets, M., Swisher, C., Roizen, N., Wolters, C., Stein, L., Stin, M., Schey, W., Remington, J., Meier, P., Johnson, D., Heydeman, P., Holfels, E., Withers, S., Mack, D., Brown, C., Patton, D. y McLeod, R. (1994). Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago collaborative treatment trial. *CID*, 18: 38-72.
- McHugh, T.D., Bathgate, T., Mang an, J., Johnson, J.D., Holliman, R.E. y Butcher, P.D. (1997). Recognition of tissue cyst-specific antigens in reactivating toxoplasmosis. *J.Med.Microbiol.*, 46: 587-595.
- Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslee, D., Muray, A., Tourvielle, B., Maes, P., Capron, A. y Cesbron-Delauw, M.F. (1993). Molecular characterisation of a dense granule antigen (Gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 58: 71-82.
- Mevelec, M., Chardes, T., Mercereau-Puijalon, P., Bourgin, I., Achbarou, A., Dubremetz, J.F. y Bout, D. (1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognised by mucosal IgA antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 56: 227-238.
- Miller, N.L., Frenkel, J.K. y Dubey, J.P. (1972). Oral infections with toxoplasma cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J.Parasitol.*, 58: 928-937.
- Mineo, J.R., McLeod, R., Mack, D., Smith, J.E., Khan, I.A., Ely, K.H. y Kasper, L.H. (1993). Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J.Immunol.*, 150: 3951-3964.
- Moir, I.J., Davidson, M.M. y Ho-yen, D.O. (1991). Comparison of IgG antibody profiles by immunoblotting in patients with acute and previous *Toxoplasma gondii* infection. *J.Clin.Pathol.*, 44: 569-572.

- Mondragon, R., Howe, D.K., Dubey, J.P. y Sibley, L.D. (1998). Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J.Parasitol.*, 84: 639-641.
- Monis, P.T. y Andrews, R.H. (1998). Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. *Int.J. Parasitol.*, 28: 981-987.
- Montoya, J.G. y Remington, J.S. (1996). Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *CID*, 23: 277-282.
- Moreno, T., Martinez-Gomez, F. y Hernandez-Rodriguez, S. (1985). Toxoplasmosis in pigs in Cordoba, Spain. *Annals Tropical Medical Parasitology*, 79: 175-180.
- Moreno, T., Martinez-Gomez, F. y Becerra, C. (1991a). The seroprevalence of ovine toxoplasmosis in Cordoba, Spain. *Annals Tropical Medical Parasitology*, 85: 287-288.
- Moreno, T., Martinez-Gomez, F. y Becerra, C. (1991b). The seroprevalence of bovine toxoplasmosis in Cordoba, Spain. *Annals Tropical Medical Parasitology*, 85: 285-286.
- Morgan, U.M., Constantine, C.C., Greene, W.K. y Thompson, R.C.A. (1993). RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzymes data. *Transations Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 702-705.
- Morgan, U.M., Constantine, C.C., O'Donoghue, P., Meloni, B.P. y O'Brien, P.A. (1995). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 52: 559-564.
- Morrisette, N.S., Bedian, V., Webster, P. y Roos, D.S. (1994). Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. *Ex.Parasit.*, 79: 445-459.
- Mullis, K.B. y Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R.K., Horn, G.T y Erlich, H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol*, 51: 263-273.
- Munday, B.L. y Corbould, A. (1979). Serological responses of sheep and cattle exposed to natural toxoplasma infection. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci*, 57: 141-145.
- Naot, Y., Barnett, E.V. y Remington, J.S. (1981). Method for avoiding false-positive results occurring in immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays due to presence of both rheumatoid factor and antinuclear antibodies. *J.Clin.Microbiol.*, 14: 73-78.
- Nbumbe, P.M. y Andela, A. (1992). Prevalence of infections affecting de child among pregnant women in Younde, Cameron. *Med. Microbiol. Immunol.*, 181: 127-130.
- Nichols, B.A., Chappino, M.L. y O'Connor, G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.*, 83: 85-98.
- Nicholsa, B.A. y Chappino, M.L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.*, 34: 217-226.
- Nicolle, C. y Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du Gondi: *Toxoplasma*. *Arch. Inst. Pasteur. Tunis*, 2: 97-103.
- Nogués, A., García, M., Ribelles, E. y Rivas, C. (1993). Toxoplasmosis aguda. Diagnóstico de laboratorio. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.*, 11: 16-19.

- Norrby, R. y Lycke, E. (1967). Factors enhancing the host-cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *J. Bacteriol.*, 93: 53-58.
- Novati, R., Castagna, A., Morsica, G., Vago, L., Tambussi, G., Chezzi, S., Gervasoni, C., Bisson, C., Arminio Monforte, A. y Lazzarin, A. (1994). Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. *AIDS*, 8: 1691-1694.
- Obwaller, A., Hassl, A., Picher, O. y Aspöck, H. (1995). An enzyme-linked immunosorbent assay with whole trophozoites of *Toxoplasma gondii* from serum-free tissue culture for detection of specific antibodies. *Parasitol. Res.*, 81: 361-364.
- Olsen, M.A. y Root, P.P. (1994). Comparison of four different immunoassays for detection of *Toxoplasma*-specific immunoglobulin G. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 19: 19-24.
- Opel, U., Charleston, W.A., Pomroy, W.E. y Rommel, M. (1991). A survey of *Toxoplasma* infection in goats in New Zealand and a comparison of the latex agglutination and indirect fluorescence test. *Vet. Paras.*, 40: 181-186.
- Ory, F., Casas, I., Domingo, C.J. y Echevarría, J.M. (1995). Application of fluoroimmunoassay to the identification of low avidity specific IgG against pathogenic human viruses and *Toxoplasma gondii*. *Clin. Diagn. Virol.*, 3: 323-332.
- Ossorio, P.N., Schwartzman, J.D. y Boothroyd, J.C. (1992). A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has an unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Paras.*, 50: 1-16.
- Ostergaard, L., Nielsen, A.K. y Black, F.T. (1993). DNA amplification on cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis among HIV-positive patients with signs or symptoms of neurological disease. *Scand. J. Infect. Dis.*, 25: 227-237.
- Oxelius, V.A. (1972). Monoclonal immunoglobulins in congenital toxoplasmosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 11: 367-380.
- Pallas Alonso, C.R. y Gomez Castillo, E. (1993). Infección congénita, aspectos actuales. *An. Esp. Pediatr.*, 38: 99-106.
- Parmley, S.F., Gross, U., Sucharczuk, A., Windeck, T. y Sgarlato, G.D. (1994). Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 80: 293-301.
- Partanen, P., Turunen, H.J., Paasivuo, R.A. y Leinikki, P.Q. (1984). Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulin G, M and A antibodies at different stages of infection. *J. Clin. Microbiol.*, 20: 133-135.
- Patel, B., Young, Y., Duffy, K., Tanner, R.P., Johnson, J. y Holliman, R.E. (1993). Immunoglobulin-A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. *J. Med. Microbiol.*, 38: 286-292.
- Papoz, L., Simondon, F., Saurin, W. y Samini, H. (1986). A simple model relevant to toxoplasmosis applied to epidemiologic results in France. *Am. J. Epidemiol.*, 123: 154-161.
- Peacock jr, J.E., Greven, C.M., Cruz, J.M. y Hurd, D.D. (1995). Reactivation toxoplasmic retinochoroiditis in patients undergoing bone marrow transplantation: is there a role for chemoprophylaxis?. *BMT*, 15: 983-987.
- Pelloux, H., Dupouy-Camet, J., Derouin, F., Aboulker, J.P. y Raffi, F. (1997). A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis. *AIDS*, 11: 1888-1889.
- Pereira-Bueno, J. y Ortega-Mora, L.M. (1997). Control. *Ovis*, 52: 59-73.

- Petithory, J.C., Reiter-Owona, I., Berthelot, F., Milgram, M., De Loye, J. y Petersen, E. (1996). Performance of european laboratories testing serum samples for *Toxoplasma gondii*. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 15: 45-49.
- Pezzella, N., Bouchot, A., Bonhomme, A., Pingret, L., Klein, C., Burlet, H., Balossier, G., Bonhomme, P. y Pinon, J.M. (1997). Involvement of calcium and calmodulin in *Toxoplasma gondii* tachyzoite invasion. *Eur.J.Cell.Biol.*, 74: 92-101.
- Pingret, L., Millot, J.M., Sharonov, S., Bonhomme, A., Manfait, M. y Pinon, J.M. (1996). Relationship between intracellular free calcium concentrations and the intracellular development of *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.*, 44: 1123-1129.
- Pinon, J.M., Foudrinier, F., Mougeot, G., Marx, C., Aubert, D., Toupance, O., Niel, G. y Danis, M. (1995). Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and analytical study of specific IgG in immunodeficient patients. *J.Clin.Microbiol.*, 33: 878-884.
- Pinon, J.M., Chemla, C., Villena, I., Foudrinier, F., Aubert, D., Puygauthier-Toubas, D., Leroux, B., Dupouy, D., Querreux, C., Talmud, M., Trenque, T., Potron, G., Pluot, M., Remy, G. y Bonhomme, A. (1996). Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J.Clin.Microbiol.*, 34: 579-583.
- Plan Nacional sobre el SIDA (1994). Toxoplasmosis e infección por VIH. In: Recomendaciones del consejo asesor clínico del Plan Nacional sobre el SIDA, edited by Secretaría del Plan Nacional sobre el SIDA Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, p. 1-12.
- Pomeroy, C. y Filice, G.A. (1992). Pulmonary toxoplasmosis: a review. *CID*, 14: 863-870.
- Post, M.J.D., Sheldan, J.J., Hensley, G., Soila, K., Tobiaas, J.A., Chan, J.C., Quencer, R.M. y Mpskowitz, L.B. (1986). Central nervous system disease in AIDS: prospective correlation using CT, MR imaging and pathologic studies. *Radiology*, 158: 929-929.
- Potasman, I., Araujo, F.G., Desmonts, G. y Remington, J.S. (1989). Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognised by human sera obtained before and after acute infection. *JID*, 154: 650-657.
- Prince, J.B., Auer, K.L., Huskinson, J., Pamley, S.F., Araujo F.G. y Remington, J.S. (1990). Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43: 97-106.
- Pullen, G.R., Fitzgerald, M.G. y Hosking, C.S. (1986). Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J.Immunol.Methods*, 86: 83-87.
- Pyndiah, N., Krech, U., Price, P. y Wilhelm, J. (1979). Simplified chromatographic separation of immunoglobulin M from G and its application to toxoplasma indirect immuno-fluorescence. *J.Clin.Microbiol.*, 9: 170-174.
- Pérez-Redón, J., Moreno-Montanez, T., Becerra, C. y Martinez-Cruz, M.S. (1992). Seroprevalencia de la toxoplasmosis humana en Córdoba. *Rev. Sanid. Hig. Publica*, 66: 83-91.
- Pérez-Tallero, E., Zulaica, D., Cilla, G., De Toro, P. y Arrizabalaga, J. (1987). Prevalencia de infección por Cytomegalovirus, Herpes simplex, Varicella-Zoster y *Toxoplasma gondii* en población drogadicta por vía endovenosa. *Anales Med Interna*, 4: 595-598.
- Quintanilla Gozalo, A., García-Villazala, B., Pereira-Bueno, J. y Ortega-Mora, L.M. (1997a). Seroprevalencia de la infección por *Toxoplasma gondii* en el ganado ovino en el noroeste de España. *Act.Paras.Portug.*, 4: 159

- Quintanilla Gozalo, A., García-Villazala, B., Pereira-Bueno, J. y Ortega-Mora, L.M. (1997b). Seroprevalencia de la infección por *Toxoplasma gondii* en ganado caprino en el noroeste de España. *Act.Paras.Portug.*, 4: 159.
- Rabjeau, A., Foussard, F., Mauras, G. y Dubremetz, J.F. (1997). Enrichment and biochemical characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite plasmalemma. *Parasit.*, 114: 421-426.
- Ramisse, J., Brebion, M., Dallet, C.M., Mohas, S. y Sirouet, J. (1981). Distribution des anticorps toxoplasmiques dans les levages caprins, ovins et bovins (Recherche par la methode HAP). *Bulletin Societe Veterinaire*, 65: 675-693.
- Reiter-Owona, I., Bialek, R., Rockstroh, J. y Seitz, H.M. (1998). The probability of acquiring primary *Toxoplasma* infection in HIV-infected patients: results of an 8-year retrospective study. *Infection*, 26: 20-25.
- Remington, J. and Desmonts, G. (1983). Toxoplasmosis. In: Infectious diseases of the fetus and newborn infant, edited by Remington, J. and Klein, JO Philadelphia: W.B.Saunders Co, p. 143-263.
- Ribera, E., López, J., Pérez, M.J. y Podzamczar, D. (1998). Toxoplasmosis cerebral. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.*, 16: 45-51.
- Richards, F.O., Kovacs, J.A. y Luft, B.J. (1995). Preventing toxoplasmic encephalitis in persons infected with human immunodeficiency virus. *CID*, 21(Suppl 1): S49-S56.
- Rinder, H., Thomschke, A., Dard, M.L. y Lescher, T. (1995). Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 69: 123-126.
- Robert, F., Ouatas, T., Blanche, P., Tourte-Schaefer, C., Sicard, D. y Dupouy-Camet, J. (1996). Evaluation retrospective de la detection de *Toxoplasma gondii* par reaction de polymerisation en chaine chez des patients sidens. *Presse Med.*, 25: 541-545.
- Robert, F. y McLeod, R. (1999). Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitology Today*, 15: 51-57.
- Rodriguez Ponce, E., Molina, J.M. y Hernandez, S. (1995). Seroprevalence of goat toxoplasmosis on Grand Canary Island (Spain). *Preventive Veterinary Medicine*, 24: 229-234.
- Rodríguez, E., Nieto, J., Castillo, J.A. y G rate, T. (1996). Characterization of spanish *Trichinella* isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Helminthology*, 70: 335-343.
- Rodríguez, J.C., Alcántara, M.J. y Royo, G. (1996). Toxoplasmosis en el embarazo: nuevas técnicas diagnósticas. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.*, 14: 145-149.
- Rodríguez, J.C., Martínez, M.M., Martínez, A.R. y Royo, G. (1997). Evaluation of different techniques in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis. *J.Med.Microbiol.*, 46: 597-601.
- Rodríguez-Feijoo, M.A., Devesa, R., Martínez-Vernal, M.A., Domingo, J., Diego, J.A. y Ballesteros, G. (1994). Prevalencia de anticuerpos frente a toxoplasma, rubeola, citomegalovirus y virus herpes simple en mujeres gestantes de Cantabria. *Clin. Invest. Gin. Obst.*, 21: 388-393.
- Ronday, M.J.H., Luyendijk, L., Baarsma, G.S., Bollemeijer, J.G., Van der Lelij, A. y Rothova, A. (1995). Presumed acquired ocular toxoplasmosis. *Arch. Ophthalmol.*, 113: 1524-1529.
- Roth, A., Roth, B., Huffken, G., Steuber, S., Khalifa, K. y Janitschke, K. (1992). Application of the polymerase chain raction in the diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis*, 11: 1177-1181.

- Ruiz, A. y Frenkel, J.K. (1980a). *Toxoplasma gondii* in Costa Rica cats. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 29: 1150-1160.
- Ruiz, A. y Frenkel, J.K. (1980b). Intermediated and transport host of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 29: 1161-1166.
- Ruiz, R., Cu-Uvin, S., Fiore, T. y Flanigan, T.P. (1997). Toxoplasmosis in HIV-positive women: seroprevalence and the role of prophylaxis in preventing disease. *AIDS*, 11: 119-120.
- Ruppanner, R., Riemann, P., Farver, T.B., West, G., Behymer, D.E. y Wiyayasinghe, C. (1978). Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) and *Toxoplasma gondii* among dairy goats in California. *Amer.J.Vet. Research*, 39: 867-870.
- Sabin, A.B. y Feldman, H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108: 660-663.
- Sacks, J.J., Delgad, D.G., Lobel, H.O. y Parker, R.L. (1983). Toxoplasmosis infection associated with eating undercooked venison. *Am. J. Epidemiol.*, 118: 832-838.
- Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B. y Dubremetz, J.F. (1988). Characterization of a family of rho-try proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitol.*, 29: 203-211.
- Sasono, P.D. y Smith, J.E. (1998). *Toxoplasma gondii* an ultrastructural study of host-cell invasion by the bradyzoite stage. *Parasitol. Res.*, 84: 640-645.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988). Primer-dimer enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Ed. 2
- San Miguel, A., Arroyo, T., Rodríguez, J., Lado, F. y Alvite, D. (1990). Estudio epidemiológico del estado inmunitario de embarazadas frente a toxoplasma y rubeola. *Rev. Diag. Biol.*, 39: 26-28.
- Santoro, F., Afchain, D., Pierce, R., Cesbron, J.Y., Ovlaque, G. y Capron, A. (1985). Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). *Clin. Exp. Immunol.*, 62: 262-269.
- Savva, D. (1989). Isolation of a potential DNA probe for *Toxoplasma gondii*. *Microbios*, 58: 165-172.
- Savva, D., Morris, J.C., Johnson, J.D. y Holliman, R.E. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J.Med.Microbiol.*, 32: 25-31.
- Savva, D., Turner, C.B., Quilez, J., Vega, J.L., Sanchez-Acedo, C. y Arruga, M.V. (1995). Detection of *Toxoplasma gondii* infection in horses and sheep using the polymerase chain reaction. *Research and Reviews in Parasitology*, 55: 177-179.
- Schoen, E.J., Black, S. y Cohen, D. (1994). Screening for neonatal toxoplasmosis. *N. Engl. J. Med.*, 331: 1458-1459.
- Schoondermark-van de Ven, E., Galama, J., Kraaijeveld, C., van Druten, J., Meuwissen, J. y Melchers, W. (1993). Value of the polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. *CID*, 16: 661-666.

- Schwartzman, J.D. y Pfefferkorn, E.R. (1983). Immunofluorescence localization of myosin at the anterior pole of coccidian *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.*, 30: 657-661.
- Selik, R.M., Karon, J.M. y Ward, J.W. (1997). Effect of the human immunodeficiency virus epidemic on mortality from opportunistic infections in the United States in 1993. *JID*, 176: 632-636.
- Sharma, S.D., Mullenas, J., Araujo, F.G., Erlich, H.A. y Remington, J.S. (1983). Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J.Immunol.*, 131: 943-947.
- Sibley, L.D. y Boothroyd, J.C. (1992a). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 511: 291-300.
- Sibley, L.D. y Boothroyd, J.C. (1992b). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359: 82-85.
- Sibley, L.D., Niesman, I.R., Asai, T. y Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii*: secretion of potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Ex.Parasit.*, 79: 301-311.
- Siegel, S.E., Lunde, M.N., Gelderman, A.H., Halterman, R.H., Brown, J.A., Levine, A.S. y Graw, R.G. (1971). Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood*, 37: 388-394.
- Singh, B. (1997). Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int.J. Parasitol.*, 10: 1135-1145.
- Singh, S. y Nautiyal, B.L. (1991). Seroprevalence of toxoplasmosis in Kumaon region of India. *Indian. J. Med. Res.*, 93: 247-249.
- Smith, J.E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int.J. Parasitol.*, 25: 1301-1309.
- Smith, J.E., Boothroyd, J.C., Hunter, C.A. y Petersen, E. (1997). Progress in toxoplasmosis research. *Parasitology Today*, 13: 245-247.
- Smits, H.L. y Hartskeerl, R.A. (1995). PCR amplification reactions in parasitology. *J.Microb.Meth.*, 23: 41-54.
- Soete, M., Fortier, B., Camus, D. y Dubremetz, J.F. (1993). *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Ex.Parasit.*, 76: 259-264.
- Sola, D., Sánchez, N., Alonso, V., Alonso, R., Abreu, N., Valladares, B., De Armas, F. y Del Castillo, A. (1997). Influencia del clima sobre la prevalencia de la toxoplasmosis en los pequeños rumiantes de Canarias. *Act.Paras.Portug.*, 4: 158.
- Soriano, V. y González-Lahoz, J. (1997). Manual del SIDA. Toxoplasmosis cerebral, IDEPSA, Madrid.pp. 291-300.
- Sousa, O.E., Saenz, R.E. y Frenkel, J.K. (1988). Toxoplasmosis in Panama: a 10 years study. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 38: 315-322.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.
- Speer, C.A. y Dubey, J.P. (1998). Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasit.*, 116: 35-42.
- Speer, C.A. y Dubey, J.P. (1998). Ultrastructure of the oocysts, sporocysts and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J.Parasitol.*, 84: 505-512.

- Speer, C.A., Tilley, M., Temple, M.E., Blixt, J.A., Dubey, J.P. y White, M.W. (1995). Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 75: 75-86.
- Stepick-Biek, P., Thulliez, P., Araujo, F.G. y Remington, J.S. (1990). IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *JID*, 162: 270-273.
- Sundermann, C.A., Estridge, B.H., Branton, M.S., Bridgman, C.R. y Lindsay, D.S. (1997). Immunohistochemical diagnosis of *Toxoplasma gondii*: potential for cross-reactivity with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.*, 83: 440-443.
- Suzuki, Y., Wong, S.Y., Grumet, F.C., Fessel, J., Montoya, J.G., Zolopa, A.R., Portmore, A., Schumacher-Perdreau, F., Schrappe, M., Koppen, S., Ruf, B., Brown, B.W. y Remington, J.S. (1996). Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *JID*, 173: 265-268.
- Tarlow, M.J. (1994). Epidemiology of neonatal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34, Suppl.: 43-52.
- Tenter, A.M. y Johnson, A.M. (1991). Recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by human sera in an ELISA. *Parasitol Res*, 77: 197-203.
- Teutsch, S.M., Juranek, D.D., Sulzer, A., Dubey, J.P. y Sikes, R.K. (1979). Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N. Engl. J. Med.*, 300: 695-699.
- Thomas, H.I. y Morgan-Capner, P. (1988). Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidemiol. Infect.*, 101: 591-598.
- Thomas, P.A. and Pelloux, H. (1998). Toxoplasmosis congénita, avances en el diagnóstico serológico y molecular. In: II Congreso Internacional de Toxoplasmosis, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogotá: Universidad de los Andes, p. 18-25.
- Thulliez, P. (1998a). Diagnóstico y manejo prenatal de la toxoplasmosis congenita. In: Memorias II Congreso Internacional de Toxoplasmosis, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogotá: Universidad de Los Andes, p. 26-32.
- Thulliez, P. (1998b). Interpretación de pruebas serológicas durante el embarazo. In: Memorias II Congreso Internacional de Toxoplasmosis, edited by Carvajal, H., Frenkel, J.K. and Sánchez, N. Bogotá: Universidad de Los Andes, p. 33-36.
- Tibayrenc, M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology*, 36: 47-109.
- Tirard, V., Niel, G., Rosenheim, M., Katlama, C., Ciceron, L., Ogunkolade, W., Danis, M. y Gentilini, M. (1991). Diagnosis of toxoplasmosis in patients with AIDS by isolation of the parasite from the blood. *N. Engl. J. Med.*, 28: 634.
- Tijssen, P. (1985). Properties and preparation of enzymes used in enzyme-immunoassays. In: Practice and theory of enzyme immunoassays, edited by Tijssen, P. Amsterdam: Editorial Elsevier, p. 173-219.
- Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D. y Dubremetz, J.F. (1991). Characterisation of bradyzoite specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immuni.*, 59: 3750-3753.
- Tsai, M.M. y O'Leary, T.J. (1993). Identification of *Toxoplasma gondii* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Modern Pathol*, 6: 185-188.

- Van de Ven, E., Melchers, J., Galama, J., Camps, W. y Meuwissen, J. (1991). Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification. *J.Clin.Microbiol.*, 29: 2120-2124.
- Van Knapen, F. y Panggabean, S.O. (1977). Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Clin.Microbiol.*, 6: 545-547.
- Van Knapen, F., Panggabean, S.O. y Van Leusden, J. (1985). Demonstration of *Toxoplasma* antigens containing complexes inactive toxoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.*, 22: 645-650.
- Van Loon, A.M. y Van der Veen, J. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. *J.Clin.Pathol.*, 33: 635-639.
- Vergani, P., Ghidini, A., Ceruti, P., Strobelt, N., Spelta, A., Zapparoli, B. y Rescaldani, R. (1998). Congenital toxoplasmosis: efficacy of maternal treatment with spiramycin alone. *AJRI*, 39: 335-340.
- Verhofstede, C., Sabbe, L. y Van Renterghem, L. (1987). Ability of enzyme-linked immunosorbent assays to detect early immunoglobulin G antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Eur.J.Clin.Microbiol.*, 6: 147-151.
- Verhofstede, C., Reniers, S., Colebunders, R., Van Wanseele, F. y Plum, J. (1993). Polymerase chain reaction in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis. *AIDS*, 7: 1539-1541.
- Violand, S.A., Mitchell, T.G. y Kleeman, K.T. (1982). Comparison of an enzyme-linked immunoassay and a quantitative indirect fluorescent-antibody test with the conventional indirect fluorescent-antibody test for detecting antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J.Clin.Microbiol.*, 16: 341-344.
- Waleska, T.C., Chiari, C.A., Figueiredo, A.R.P., Orefice, F. y Antunes, C.M.F. (1993). Toxoplasmosis and mental retardation. Report of a case-control study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 88: 253-261.
- Ware, P.L. y Kasper, L.H. (1987). Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect.Immun.*, 55: 778-783.
- Wastling, J.M., Nicoll, S. y Buxton, D. (1993). Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep. *J.Med.Microbiol.*, 38: 360-365.
- Weigel, R.M., Dubey, J.P., Siegel, A.M., Kitron, U.D., Mannelli, A., Mitchell, M.A., Mateus-Pinilla, N.E., Thulliez, P., Shen, S.K., Kwok, O.C.H. y Todd, K.S. (1995). Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *J.Parasitol.*, 81: 736-741.
- Weiss, L.M., Udem, S.A., Tanowitz, H. y Wittner, M. (1988). Western blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and toxoplasma encephalitis: antigenic diversity among *Toxoplasma* strains. *JID*, 157: 7-13.
- Weiss, L.M., Udem, S.A., Salgo, M., Tanowitz, H.B. y Wittner, M. (1991). Sensitive and specific detection of *Toxoplasma* DNA in an experimental murine model: Use of *Toxoplasma gondii* specific cDNA and the polymerase chain reaction. *JID*, 163: 180-186.
- Weiss, L.M., LaPlace, D., Tanowitz, H.B. y Wittner, M. (1992). Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoite specific monoclonal antibodies. *JID*, 166: 213-215.
- White, T.J., Arnheim, N. y Erlich, H.A. (1989). The polymerase chain reaction. *TIG*, 5: 185-189.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Wilso, S.M. (1991). Nucleic acid techniques and the detection of parasites diseases. *Parasitology Today*, 7: 255-259.
- Wilson, M., Remington, J.S., Clavet, C., Varnery, G., Press, C., Ware, D. y The FDA Toxoplasmosis ad Hoc Working group (1997). Evaluation of six commercial kits for detection of human Immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J.Clin.Microbiol.*, 35: 3112-3115.
- Windeck, T. y Gross, U. (1996). *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. *Parasitology Research*, 82: 715-719.
- Wong, S.Y., Hajdu, M.P., Ramirez, R., Thulliez, P., McLeod, R. y Remington, J.S. (1993). Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *J.Clin.Microbiol.*, 31: 2952-2959.
- Wong, S.Y. y Remington, J. (1994). Toxoplasmosis in pregnancy. *CID*, 18: 853-862.
- Woodward, B.C. (1982). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay specific for human immunoglobulin G as a screening test for detecting anti-toxoplasma antibodies. *J.Clin.Microbiol.*, 16: 367-372.
- Wreghitt, T.G., Hakim, M., Gray, J.J., Balfour, A.H., Stovin, P.G.I. y Stewar, S. (1989). Toxoplasmosis in heart and lung transplant recipients. *J.Clin.Pathol.*, 42: 194-199.
- Wyne de Martini, G.J. y Martjn, A.M. (1977). Prueba de hemoaglutinación para toxoplasmosis en distintos sueros de animales. *Rev Med Vet (Argentina)*, 58: 437-444.
- Yadlapati, S., Dorsky, D., Remington, R.L., Edwards, R.L., Feingold, J.M., Tutschka, P.J. y Bilgrami, S. (1997). Ocular toxoplasmosis after autologus peripheral-blood stem-cell transplantation. *CID*, 25: 1255-1256.
- Zhang, Y.W. y Smith, J.E. (1995). *Toxoplasma gondii*: identification and characterisation of a cyst molecule. *Ex.Parasit.*, 80: 228-233.
- Zufferey, J., Sugar, A., Rudaz, P., Bille, J., Glauser, M.P. y Chave, J.P. (1993). Prevalence of latent toxoplasmosis and serological diagnosis of active infection in HIV-positive patients. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 12: 591-595.

ANEXO

ANEXO I.

CONTROLES EMPLEADOS EN LA TÉCNICA PCR

En todas las amplificaciones realizadas se incluyeron controles positivos y negativos. Como control positivo se utilizó una solución de ADN correspondiente a 10 parásitos, lo que permitió determinar el correcto funcionamiento de la técnica. Como controles negativos se incluyeron dos tipos de blancos, uno usando agua en vez de muestra, con lo que se pudo monitorizar la posible contaminación durante el proceso de mezcla de los reactivos y de la amplificación y otro con el tampón de lisis empleado en la extracción de la muestra, que siguió todo el proceso como una muestra más, para conocer la existencia de contaminación cruzada durante el proceso de extracción de ADN.

Los resultados obtenidos con las muestras no se consideraron válidos, si alguno de los controles no dio el resultado esperado.

ANEXO II.

PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Dada la sensibilidad de la técnica PCR, es muy importante evitar los problemas de contaminación con otras muestras o, lo que es peor, con productos de la amplificación. Por esto, en el desarrollo de las técnicas, se tomaron todas las medidas recomendadas para evitar la contaminación (Kwok 1990).

En todo momento se usaron guantes que fueron cambiados con frecuencia.

Las distintas fases de la técnica (extracción de ADN, preparación de la mezcla de reacción y análisis de los productos de la amplificación) se realizaron en distintos laboratorios, con distintos juegos de pipetas y cambio de batas.

Se usaron puntas de pipetas de desplazamiento positivo y puntas con filtro estériles para evitar la contaminación con aerosoles.

Se tomaron otra serie de medidas como la descontaminación de las zonas con etanol y con NaOH 0,2N, así como el tratamiento de los utensilios con luz ultravioleta y esterilización en el autoclave.

ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA a la MUJER EMBARAZADA.

Nombre:

Fecha:

Dirección:

Tlfono:

Edad:

Mes de gestación:

Sintomas previos: pregestacional gestacional (mes)

Adenopatias:

Fiebre:

Sint. gripal:

Otros:

Tratamiento específico. Tipo:

Duración:

Diagnósticos anteriores de toxop;

A. Alimentación cárnica

1. Carne frita (o plancha) en alimentación domiciliaria (no pollo). No: Si:

* Preparación: normal: muy hecha (pasada): poco hecha (semicruda):

* Frecuencia semanal ¹: < 1 vez - 1 a 3 veces - 4 a 5 veces - diaria

* Manejo de carne cruda en casa². No: Si: -frecuente -esporádico

2. Carne frita fuera del hogar (restaurante / casa de comidas)³. No: Si:

* Preparación: normal - muy hecha (pasada) - poco hecha (semicruda)

* Frecuencia semanal: < 1 vez - 1 a 3 veces - 4 a 5 veces - diaria

3. Consumo de hamburguesas fuera del hogar. No: Si:

* Frecuencia semanal : < 1 vez - 1 a 3 veces - 4 a 5 veces - diaria

4. Consumo de embutido. No: Si:

* Tipo: Casero -Industrial- Ambos -Cual más

* Frecuencia: < 1 vez - 1 a 3 veces - 4 a 5 veces - diaria

B. Relación con gatos: No : Si:

* Gato en casa. Edad: meses - joven -viejo - > de 1 gato

Gato sin salidas externas ⁴ gato con salidas

Contactos directos ⁵ limpieza habitaculos animal

* Gatos en el entorno del hogar (en la calle o alrededores casa)

Frecuentes - esporádicos - nunca

C. Contactos con tierra.

* Labores de jardinería ⁶. No Si: -frecuente (varias mes) - esporádica

* Otros contactos con tierra. No: Si (juego jardines, trabajos,etc):

D. Otros datos epidemiológicos.

* Costumbre de lavar las verduras crudas. No: Si:

E. Trabajo profesional relacionado con carne (camicería,matadero,etc.).

No: Si:

Aclaraciones a la encuesta.

1. 1 ó 2 veces recogería p.e. los fines de semana y 3 o más la mujer que come a diario en el trabajo.

2. Manejo p.e sería hacer carne picada (hamburguesas, albóndigas, etc.)

3. Comer carne fuera del hogar no excluye comer también carne en casa.

4. Las salidas externas del gato dependen del tipo de vivienda. La vivienda baja da posibilidad de salida externa y la vivienda situada en un piso alto no, excepto que el propietario traslade al animal a otro domicilio.

5. La relación con el gato es que la mujer tenga contactos o caricias con el animal.

6. Labores jardín familiar o cambios de la tierra de macetas.